

Dossier de candidature au diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches

(Arrêté du 23 Novembre 1988)

Auprès de l'Université de Rennes I

Présenté par Emmanuel ALBINA

Chargé de recherche de 1^{ère} classe
(Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments)

Virologiste - Immunologiste au Centre de Coopération Internationale en Recherche
Agronomique pour le Développement (CIRAD)

Remerciements

La préparation et la présentation de ce mémoire n'auraient sans doute pas été possibles sans le soutien actif de la direction du CIRAD-Emvt au travers des personnes de Didier Richard, d'Hubert Guérin (Directeur-Adjoint du Cirad-Emvt) et d'Emmanuel Camus (Chef du Programme Santé Animale).

Pour la relecture de ce mémoire et leurs critiques constructives, je remercie Emmanuel Camus et Adama Diallo.

Philippe Vannier m'a accordé sa confiance pour diriger l'Unité de Virologie et Immunologie Porcine de l'Afssa Ploufragan de 1992 à 2000. Il m'a laissé une grande autonomie dans les choix et orientations scientifiques de cette unité. J'ai ainsi pu réaliser un certain nombre de projets qui me tenaient à cœur et qui constituent le corps de ce mémoire. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude.

André Jestin a été mon compagnon de route de ces 8 dernières années. Sa sagacité scientifique et sa rigueur intellectuelle ont été une aide inestimable. Qu'il en soit ici remercié.

Je souhaite enfin remercier tous ceux qui ont partagé mon aventure professionnelle avec conviction et patience. Sans oublier mes nouveaux collègues du CIRAD, en particulier ceux de l'unité de virologie, dont l'accueil a été particulièrement chaleureux.

Sommaire

REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE.....	3
LISTE DES ABBREVIATIONS	5
A) IDENTIFICATION DU CANDIDAT ET DE SON PROJET	6
A1) CURRICULUM VITAE	7
<i>Etat civil :</i>	7
<i>Titres :</i>	7
<i>Activités de recherche : Virologie et immunologie porcines</i>	8
Principales recherches en virologie :	8
Principales recherches en immunologie :	8
Principales recherches en vaccinologie :	8
<i>Implications dans des organisations et comités scientifiques :</i>	9
<i>Activités d'enseignement :</i>	9
<i>Liste des activités d'encadrement (DEA, Thèse et % de responsabilité) :</i>	9
<i>Activités administratives :</i>	10
<i>Préparation et gestion de contrats avec partenaires :</i>	10
<i>Langues :</i>	10
A2) ACTIVITES DE RECHERCHE	11
<i>Liste des ouvrages édités :</i>	11
<i>Liste des publications dans des revues à comité de lecture : (en souligné, en tant que responsable des travaux).....</i>	<i>11</i>
Revue internationale	11
Revue française	13
<i>Liste des publications dans d'autres revues :</i>	<i>13</i>
Revue internationale	13
Revue française	14

<i>Liste des communications à des colloques ou conférences en tant qu'invité (en souligné, en tant qu'orateur)</i>	<i>15</i>
<i>Autres communications à des colloques ou conférences</i>	<i>15</i>
<i>Brevets :</i>	<i>18</i>

B) DOCUMENT DE SYNTHÈSE : DE L'ÉTUDE DES VIRUS ET DE LEURS EFFETS PATHOGENIQUES À LA CONCEPTION D'OUTILS DE DIAGNOSTIC ET DE CONTRÔLE VACCINAL 19

B1) AVANT-PROPOS	20
B2) ÉTUDES VIROLOGIQUES ET PATHOGENIQUES : APPLICATION À LA MISE AU POINT D'OUTILS DE DIAGNOSTIC	21
B3) ÉTUDES IMMUNOPATHOGENIQUES : AIDE AU CONTRÔLE DE L'INFECTION ET DÉVELOPPEMENT DE VACCINS	27
<i>B3-1) – Étude du pouvoir immunodépresseur des virus :</i>	<i>27</i>
<i>B3-2) - Développement immunologiques :</i>	<i>31</i>
<i>B3-3) – Nouvelles stratégies vaccinales : modulation des réponses immunes par l'ADN nu et immunisation par voie orale</i>	<i>35</i>
1 - Vaccination par l'ADN nu	35
2 - Vaccination orale et microsphères biodégradables	36
<i>B3-4) – Nouvelles perspectives au sein du Centre de Coopération internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD)</i>	<i>38</i>
B4) ORGANISATION DE LA RECHERCHE ET GESTION DE PROJETS	40
B5) CONCLUSION GÉNÉRALE	41
B6) RÉFÉRENCES COMPLÉMENTAIRES	42
ANNEXE.....	43

Liste des abbréviations

ADN :	acide désoxyribonucléotidique
AFSSA :	agence française de sécurité sanitaire des aliments
ARN :	acide ribonucléotidique
BrDU :	bromo-desoxyuridine
CIRAD :	centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement
CNEVA :	centre national d'études vétérinaires et alimentaires
CSF :	classical swine fever
CTL :	cytotoxic T lymphocyte
EAV :	equine arterivirus
GM-CSF :	granulocyte/monocyte-colony stimulating factor
IFN γ :	interféron gamma
Ig :	immunoglobulin
IL :	interleukine
IM :	intramusculaire
LDV :	lactate dehydrogenase elevating virus
MAP :	maladie de l'amaigrissement du porcelet (<i>Circovirus</i>)
NFkB :	nuclear factor kB
PBMC :	peripheral blood mononuclear cell
PPA :	peste porcine africaine
PPC :	peste porcine classique
RT-PCR :	reverse transcription-polymerase chain reaction
SDRP :	syndrome dygénésique et respiratoire porcin (<i>Arterivirus</i>)
SHFV :	simian hemorrhagic fever virus
TCID :	tissue culture infectious dose
Th :	T helper (lymphocyte T auxiliaire)
TNF :	tumor necrosis factor
VMA :	virus de la maladie d'Aujeszky (<i>Herpesvirus</i>)

A) Identification du candidat et de son projet

A1) Curriculum Vitae

Etat civil :

Nom : ALBINA

Date de naissance : 28/08/64

Prénom : EMMANUEL

37 ans

Situation de famille : Marié, 2 enfants

Dégagé des obligations militaires

Adresse : Emmanuel ALBINA

254 Rue du Clos

téléphone : 04 67 55 56 28

34730 Prades-le-Lez

e_mail : emmanuel.albina@libertysurf.fr

Situations administratives :

- 1990-1994 : Attaché de recherches vétérinaires au Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires (CNEVA), chef du service de virologie (1992-1995)
- Depuis 1995 : Chargé de recherches vétérinaires au Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires (CNEVA) puis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire et Alimentaire, chef de l'unité de virologie (1996-2000)
- Depuis mai 2000 : détaché au département élevage et médecine vétérinaires du centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD), chef de l'unité de virologie depuis février 2001.

Titres :

- Baccalauréat série C, Nantes (1982)
- Doctorat Vétérinaire, Faculté de Médecine de Nantes (1988) : « Etude des effets de deux sortes de fibres alimentaires sur la structure histologique de l'intestin de rat »
- Diplôme d'Etudes Approfondies, Université de Rennes I (1988) : « Effets des gommes de guar et du son de blé sur la motricité et le transit gastro-intestinal ; Conséquences sur la glycémie postprandiale »
- Diplôme d'Immunologie Générale de l'Institut Pasteur, Paris (1992)
- Autorisation à l'expérimentation animale n°006941 dans le cadre d'études de pathogénicité et de vaccinologie : Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (1994)
- Management et communication : formation CEGOS (1995)
- Doctorat de l'Université de Rennes I (félicitations du jury, 1997) : « Contribution au diagnostic d'une infection du porc due à un artérovirus et étude de la persistance virale et de ses effets sur le système immunitaire du porc », 173p.

Activités de recherche : Virologie et immunologie porcines

Principales recherches en virologie :

- Epidémiologie moléculaire et étude de la variabilité antigénique du virus de la peste porcine africaine et des réponses immunes antivirales (cinquième programme cadre de recherche et développement, qualité de la vie et gestion des ressources du vivant, QRLT-200-02216, contractant, 2001-2004)
- Isolement et identification de l'agent infectieux responsable de la maladie de l'amaigrissement du porcelet; Mise au point d'outils diagnostiques et contribution au développement d'un vaccin ADN nu (convention comité régional porcin, conseil général des Côtes d'Armor et conseil régional de Bretagne, 1996-1999).
- Etude de la variabilité antigénique et moléculaire de l'artérovirus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin; Implications pour le diagnostic de l'infection (1993-1997).
- Isolement de l'artérovirus porcin responsable du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin, reproduction expérimentale et mise au point d'un test ELISA (1991-1992).

Principales recherches en immunologie :

- Caractérisation des réponses immunitaires cytotoxiques spécifiques du virus de la peste porcine classique en vue du développement d'un vaccin ADN nu (1999-2002).
- Développement de méthodes non radioactives d'investigation de la réponse immunitaire à médiation cellulaire chez le porc (1996-2000).
- Mise au point du diagnostic sérologique du SDRP à partir de prélèvements de sang effectués sur papier buvards (convention ministère de l'agriculture et de la pêche, direction générale de l'alimentation, 1994-1996).
- Etude de la persistance de l'artérovirus chez le porc infecté et effets sur le système immunitaire : hypothèse sur les mécanismes permettant l'établissement d'une infection persistante (1993-1997).

Principales recherches en vaccinologie :

- Vaccination orale des porcs avec une protéine incorporée dans des microsphères biodégradables (convention ministère de l'agriculture et de la pêche, direction générale de l'alimentation, 1996-2002).
- Vaccination génétique de porcs contre le virus de la maladie d'Aujeszky; Amélioration de l'efficacité vaccinale à l'aide de cytokines porcines (programme européen FAIR III PL96-1317, 1997-2000).
- Vaccination orale de porcs et de sangliers contre la peste porcine classique avec une souche vaccinale vivante atténuée et étude d'innocuité pour espèces non cibles (convention ministère de l'agriculture et de la pêche, direction générale de l'alimentation, 1995-1998).

Implications dans des organisations et comités scientifiques :

- Membre de la société européenne de virologie vétérinaire (ESVV)
- Membre du comité d'édition de la revue *Veterinary Research*, reviewer pour la revue *Journal of General Virology* et *Veterinary Immunology and Immunopathology*.
- Organisateur et membre du comité scientifique du troisième congrès international sur le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin et sur la maladie d'Aujeszky, Ploufragan, 21-24 juin 1999 (312 personnes).

Activités d'enseignement :

- Cours de production animale, étudiants vétérinaires de 4^{ème} année (ENVN) : tous les ans depuis 1993
- Cours pour des techniciens d'élevage : tous les ans depuis 1993
- Cours supérieur de production animale INA Grignon : 1993, 1997 et 1999
- Cours sur les maladies réglementées, vétérinaires et techniciens des services vétérinaires : 1993
- Cours de DEA, Université de Paris VII, module virologie : 1997 et 1999
- Cours de DEA, Université de Rennes I, relations hôte-virus, 1998 et 1999

Liste des activités d'encadrement (DEA, Thèse et % de responsabilité) :

- Encadrement scientifique et technique d'une équipe de 15 personnes travaillant en virologie et immunologie porcines : juillet 1992 – avril 2000 (100%)
- Encadrement d'un stage de fin d'études à l'Université Catholique de Lyon : L. Piriou, mai à juin 1995 (100%)
- Encadrement d'un stage de maîtrise de biotechnologie de l'Université Catholique de Lyon : L. Piriou, janvier 1996 à juillet 1996 (100%)
- Encadrement d'un stage de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes : L. Piriou, janvier 1996 à septembre 1997 (100%)
- Encadrement d'un stage de DEA : L. Piriou, 1997 à 1998 (100%)
- Encadrement de thésards :
 - A. Le Gall : janvier 1993 à décembre 1996 (75%)
 - L. Piriou : septembre 1998 à décembre 2001 (90%)
 - A-M. Torché : septembre 1996 à juin 2000 (20 %)
- Encadrement de scientifiques post-doctorants :
 - J. Torrison (USA) : janvier à décembre 1993 (50%)
 - C. Shenqyi (Taiwan) : octobre 1993 (100%)
 - E. Cornaglia (Canada) : mai 1994 (100%)

- T. Dung Nguyen (Vietnam) : juin- novembre 1996 (50%)
- C. Truong (France) : janvier 1998 à décembre 2000 (100%)
- V Dufour (France) : février 1998 à juin 2000 (50%)
- A-M Torché (France) : août 1999 à août 2001 (60%)

Activités administratives :

- Responsable de l'unité de virologie du programme santé animale du département élevage et médecine vétérinaire du CIRAD depuis le 1^{er} février 2001 (6 scientifiques, 2 techniciens). A ce titre, responsable du laboratoire national de référence sur la fièvre catarrhale du mouton et du laboratoire de référence de l'office international des épizooties sur la peste bovine et la peste des petits ruminants.
- Responsable de la gestion des installations expérimentales animales du Cirad depuis janvier 2001.
- Chef de l'unité de Virologie et Immunologie Porcines du CNEVA, puis de l'AFSSA site de Ploufragan (1992-2000, 6 scientifiques, 6 techniciens et 3 aides techniques). A ce titre, responsable du laboratoire national de référence sur la peste porcine classique (PPC) et laboratoire de référence associé sur la maladie d'Aujeszky à l'Office International des Epizooties.
- Evaluation des demandes d'autorisation de mise sur le marché et d'essais cliniques des vaccins porcins (environ 4 dossiers par an).
- Missions d'expertises auprès de la Commission Européenne portant sur la peste porcine classique (15 missions), le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (7 missions) et la maladie d'Aujeszky (1 mission).
- Mise sous assurance qualité de l'unité virologie et immunologie porcines, 12 juillet 1999.

Préparation et gestion de contrats avec partenaires :

- Contractant de deux projets de recherche européens de trois ans
- Bénéficiaire de quatre conventions pluriannuelles

Langues :

- Anglais (lu, écrit et parlé)
- Espagnol (notions)

A2) Activités de recherche

Liste des ouvrages édités :

1. P. VANNIER, **E. ALBINA**. Bovine viral diarrhea and border disease. *Diseases of swine*, 8th edition, Iowa State University Press (1999), 113-118.
2. Third International Symposium on PRRS and Aujeszky's Disease. Ploufragan, France, June 21-24, 1999. Proceedings and abstracts. **E ALBINA** and P VANNIER, Editors. *Veterinary Research* (2000), 31(1), 1-162.

Liste des publications dans des revues à comité de lecture : (en souligné, en tant que responsable des travaux)

Revues internationales

3. C. CHERBUT, **E. ALBINA**, M. CHAMP, J.L. DOUBLIER, G. LECANNU. Action of guar gums on the viscosity of digestive contents and on the gastrointestinal motor function in pig. *Digestion* (1990), 46(4), 205-213.
4. E. ALBINA, Y. LEFORBAN, T. BARON, J. PLANA DURAN, P. VANNIER. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Annales de Recherches Vétérinaires* (1992), 23, 167-176.
5. T. BARON, **E. ALBINA**, Y. LEFORBAN, F. MADEC, H. GUILMOTO, J. PLANA DURAN, P. VANNIER. Report on the first outbreaks of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in France. Diagnosis and viral isolation. *Annales de Recherches Vétérinaires* (1992), 23(2), 161-166.
6. E. ALBINA, Ph. BUFFEREAU. Development and use of an immunoenzyme technique for the routine diagnosis of the porcine reproductive and respiratory syndrome. *Revue Scientifique de l'Office International des Epizoties* (1993), 12 (2), 523-535.
7. G. WENSVOORT, J.J.M. MEULENBERG, D.M. BENFIELD, A. NELSON, K. CONZELMANN, H.J. THIEL, **E. ALBINA**, T.W. DREW. The Porcine reproductive and respiratory syndrome characteristics and diagnostic of the causative virus. *Veterinary Biotechnology Newsletter* (1993), 3, 113-120.
8. E. ALBINA, F. MADEC, R. CARIOLET, J. TORRISON. Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pig and farm units. *The Veterinary Record* (1994), 134(22), 567-73.
9. E. ALBINA. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) : An overview. *Veterinary Microbiology* (1997), 55(1-4), 309-316.
10. M-F. LE POTIER, P. BLANQUEFORT, E. MORVAN, **E. ALBINA**. Results of a control programme for the porcine reproductive and respiratory syndrome in the French « Pays de la Loire » region. *Veterinary Microbiology* (1997), 55(1-4), 355-360.

11. A. LE GALL, **E. ALBINA**; R. MAGAR, J.P. GAUTHIER. Antigenic variability of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolates. Influence of virus passage in pig. *Veterinary Research* (1997), 28(3), 247-257.
12. O. LEGEAY, S. BOUNEIX, M. DENIS, C. ARNAULD, E. HUTET, R. CARIOLET, **E. ALBINA**, A. JESTIN. Development of a RT-PCR test coupled with a microplate colorimetric assay for the detection of a swine Arterivirus (PRRSV) in boar semen, *Journal of Virological Methods* (1997), 68(1), 65-80.
13. E. ALBINA, L. PIRIOU, E. HUTET, R. CARIOLET, R. L'HOSPITALIER. Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Veterinary Immunology and Immunopathology* (1998), 61, 49-66.
14. E. ALBINA, C. CARRAT, B. CHARLEY. Interferon alpha response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Journal of Interferon and Cytokine Research* (1998), 18, 485-490.
15. A. LE GALL, O. LEGEAY, H. BOURHY, C. ARNAULD, **E. ALBINA**, A. JESTIN. Molecular variation in the nucleoprotein gene (ORF7) of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Research* (1998), 54(1), 9-21.
16. G. CHENUT, A-F SAINTILAN, C. BURGER, F. ROSENTHAL, C. CRUCIERE, M. PICARD, V. BRUYERE, **E. ALBINA**. Oral immunisation of swine with a classical swine fever vaccine (Chinese strain) and transmission studies in rabbits and sheep. *Veterinary Microbiology* (1999), 64(4), 265-76.
17. A-M TORCHE, **E. ALBINA**, P. LE CORRE, A. JESTIN, R. LE VERGE. Flow cytometric and optical microscopic evaluation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres phagocytosis by pig alveolar macrophages. *Journal of Controlled Release* (1999), 58(3), 289-301.
18. V. DUFOUR, C. ARNAULD, O. LANTZ, I. PEGUILLET, K. MORVILLIERS, **E. ALBINA**, A. JESTIN. Quantification of porcine cytokine gene expression using RT-PCR, a homologous internal control and chemiluminescence for microplate detection. *Journal of Immunological Methods* (1999), 229, 49-60.
19. F. MADEC, E. EVENO, P. MORVAN, L. HAMON, P. BLANCHARD, R. CARIOLET, N. AMENNA, H. MORVAN, C. TRUONG, D. MAHE, **E. ALBINA**, A. JESTIN. Post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livestock Production Science* (2000), 63, 223-233.
20. A-M. TORCHE, P. LE CORRE, **E. ALBINA**, A. JESTIN, R. LE VERGE. PLGA Microspheres phagocytosis by pig alveolar macrophages: influence of poly(vinyl alcohol) concentration, nature of loaded-protein and copolymer nature. *Journal of Drug Targeting* (2000), 7(5), 343-354.
21. E. ALBINA, A. MESPLÈDE, G. CHENUT, M.F. LE POTIER, G. BOURBAO, S. LE GAL, Y. LEFORBAN. A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *Veterinary Microbiology* (2000), 77, 43-57.
22. A-M. TORCHE, H. JOUAN, P. LE CORRE, **E. ALBINA**, R. PRIMAULT, A. JESTIN, R. LE VERGE. Ex vivo and in vivo PLGA microspheres uptake by pig ileal Peyer's patch segment. *International Journal of Pharmaceutics* (2000), 201, 15-27.

23. V. DUFOUR, S. CHEVALLIER, R. CARIOLET, S. SOMASUNDARAM, F. LEFEVRE, A. JESTIN, **E. ALBINA**. Induction of porcine cytokine mRNA expression after DNA immunization and pseudorabies virus infection. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, (2000), 20, 889-895.
24. D. MAHE, P. BLANCHARD, C. TRUONG, C. ARNAULD, P. LE CANN, R. CARIOLET, F. MADEC, **E. ALBINA**, A. JESTIN. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *Journal of General Virology* (2000), 81, 1815-1824.
25. L. PIRIOU, S. CHILMONCZYK, N. GENETET, **E. ALBINA**. Design of a flow cytometric assay for the determination of NK and CTL activity in human and in different animal species. *Cytometry*, (2000), 41, 289-97.
26. C. TRUONG, D. MAHE, P. BLANCHARD, M. LE DIMNA, E. EVENO, F. MADEC, A. JESTIN, **E. ALBINA**. Development of a peptide-based immunoassay for serodiagnosis of porcine circovirus type 2. *Archives of Virology* (2001), 146, 1197-1211.
27. E. ALBINA, C. TRUONG, E. HUTET, P. BLANCHARD, R. CARIOLET, R. L'HOSPITALIER, D. MAHE, C. ALLEE, H. MORVAN, N. AMENNA, M. LE DIMNA, F. MADEC, A. JESTIN,. An experimental model of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing pigs. *Journal of Comparative Pathology* (2001), 125 (4), p 292-303.

Revues françaises

28. M. AUBERT, M. PICARD, E. FOUQUET, J. CONDE, C. CRUCIERE, R. FERRY, **E. ALBINA**, J. BARRAT, F. VEDEAU. La peste porcine classique du sanglier en Europe. *Annales de Médecine Vétérinaire* (1994), 138, 239-247.
29. E. ALBINA. Le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin : dix ans d'expérience (1986-1996) sur une infection virale insolite. *Veterinary Research* (1997), 28(4), 305-352.
30. E. ALBINA. Le virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin : le dernier-né des artérovirus. *Virologie* (2000), 4, 113-121.

Liste des publications dans d'autres revues :

Revues internationales

31. E. ALBINA, Y. LEFORBAN, T. BARON, J. PLANA DURAN. Blue-eared pig disease in Brittany. *The Veterinary Record* (1992), January 18, 58-59.
32. E. ALBINA, Y. LEFORBAN, T. BARON, J. PLANA DURAN. Blue-eared pig disease in Brittany : a new test. *The Veterinary Record* (1992), January 25, 83-84
33. E. ALBINA, Y. LEFORBAN. Demystifying mystery pig disease. *European Biotechnology Newsletter* (1992), 135.
34. E. ALBINA. A sindroma reprodutiva e respiratoria dos suínos. *Revista Técnica de Suinicultura* (1997), 13 (2), 2-48.

35. P. LE CANN, **E. ALBINA**, F. MADEC, R. CARIOLET, A. JESTIN. Piglet wasting disease. *The Veterinary Record* (1997), 141(25), 660.
36. E. ALBINA. PRRS - Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Pig Progress* (1998), 24-27.

Revues françaises

37. E. ALBINA, F. MADEC, P. VANNIER. Syndrome Dysgénésique et Respiratoire du Porc (SDRP) (PRRS - Maladie Mystérieuse). *Journées Rech. Porcine en France* (1991), 24, 115-126.
38. E. ALBINA, Y. LEFORBAN, T. BARON, J. PLANA DURAN, P. VANNIER. Mise au point d'un test ELISA pour la détection des anticorps dirigés contre le virus responsable du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire du Porc (SDRP). *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, (1992), 65, 125-134.
39. E. ALBINA, Y. LEFORBAN, F. MADEC, P. VANNIER. Diagnostic d'une intoxication aiguë du porcelet par le lindane : approche clinique, épidémiologique et analytique en élevage porcin. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, (1992), 168 (6/7), 411-416
40. E. ALBINA, F. MADEC, R. CARIOLET, F. PABOEUF, E. HUTET, J.F. PANSART, A. KERANFLEC'H, Y. LEFORBAN. Le Syndrome Dysgénésique et Respiratoire du Porc (SDRP) : Persistance du virus chez l'animal et dans les élevages infectés. *Journées Rech. Porcine en France* (1993), 25, 363-372.
41. E. ALBINA, F. MADEC. Le Syndrome Dysgénésique et Respiratoire du Porc (SDRP). Données actuelles sur une nouvelle maladie. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* (1993), 193-202. [et *Veterinary Sciences and Techniques - Vietnam Veterinary Association* (1994), 1 (4), 23-30].
42. E. ALBINA, M. KOBISCH, R. CARIOLET, P. MORVAN, A. KERANFLEC'H, B. BEAUREPAIRE, E. HUTET, A. LABBE. Le Syndrome Dysgénésique et Respiratoire du Porc (SDRP) : Etude expérimentale des effets de l'infection sur la réponse immunitaire et la résistance aux infections *Aujeszky* et *Mycoplasma hyopneumoniae* chez le porc en croissance. *Journées Rech. Porcine en France*, (1995), 27, 107-116. [et *Veterinary Sciences and Techniques, Vietnam Veterinary Association* (1995), 2(2), 34-39].
43. F. MADEC, **E. ALBINA**, S. BERTHELOT, J.F. PANSART. Etude séro-épidémiologique de l'infection SDRP en Bretagne sur la période de Novembre 1991 - Février 1993. *Journées Rech. Porcine en France* (1994), 26, 13-18.
44. A. MESPLEDE, **E. ALBINA**. Le point sur la peste porcine classique : épidémiologie et contrôle. *Le Point Vétérinaire* (1997), 28 (187), 35-47.
45. P. VANNIER, M. KOBISCH, MF LE POTIER, A. MESPLEDE, F. MADEC, **E. ALBINA**. Les vaccins et leur utilisation intégrée dans les stratégies de lutte contre les grandes maladies infectieuses du porc. *Journées Rech. Porcine en France* (1998), 30, 389-398.
46. F. MADEC, E. EVENO, P. MORVAN, L. HAMON, H. MORVAN, **E. ALBINA**, C. TRUONG, E. HUTET, R. CARIOLET, C. ARNAULD, A. JESTIN. La maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP) en France : 1- Aspects descriptifs, impact en élevage. *Journées Rech. Porcine en France* (1999), 31, 347-354.

47. C. TRUONG, P. LE CANN, Ph. BLANCHARD, E. HUTET, **E. ALBINA**, A JESTIN, R. CARIOLET, F. MADEC. La maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP) : 2- Etudes expérimentales, virologiques et sérologiques. *Journées Rech. Porcine en France* (1999), 31, 355-360.

Liste des communications à des colloques ou conférences en tant qu'invité (en souligné, en tant qu'orateur)

1. E. ALBINA. Diagnostic et épidémiologie du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire du Porc (SDRP) en France. *Séminaire de l'Association Française de Médecine Vétérinaire Porcine* (1992), Paris (France), 4 mars, 5-12.
2. E. ALBINA, F. MADEC, R. CARIOLET. Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory virus in infected animals and farm units. *44th annual meeting of European Association for Animal Production (EAAP)* (1993), Aarhus (Denmark), 16-19 August, 402-403.
3. E. ALBINA. Intégration fonctionnelle du système immunitaire : influence de l'environnement. *Séminaire de l'Association Française de Médecine Vétérinaire Porcine* (1993), Ploufragan (France), 25 mars, 4-65.
4. E. ALBINA. Epidemiology of PRRS : an overview. *2nd International Symposium on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS)* (1995), Copenhagen (Denmark), August 9th to 10th, 23.
5. E. ALBINA, P. VANNIER. Le SDRP : rôle dans la pathologie respiratoire et immunité anti-infectieuse. *Séminaire Actualités en Pathologie Porcine* (1995), Ploufragan (France).
6. E. ALBINA. Actualités sur le virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (SDPR). *Séminaire de l'Association Française de Médecine Vétérinaire Porcine* (1996), Maisons-Alfort (France), 5-6 Décembre, 11-25.
7. E. ALBINA, P. BLANQUEFORT, P. VANNIER, M-F. LE POTIER, A. MESPLÈDE, D. DELZESCAUX. Strategy for control and eradication of pig diseases : the example of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in France. *28th annual meeting of the Italian Association for Swine Pathology and Production* (2001), Parma (Italy), March 23-24th, 75-87.

Autres communications à des colloques ou conférences

8. E. ALBINA, Y. LEFORBAN, T. BARON, J. PLANA DURAN, P. VANNIER. Enzyme linked immunosorbent assay (Elisa) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *12th International Pig Veterinary Society Congress, Bologna (Italy)*, (1992), August 17-20, 112.
9. E. ALBINA, Y. LEFORBAN, R. CARIOLET. Antibody pattern of young piglets born of sows experimentally infected with a new swine Togavirus. *3rd International Veterinary Immunology Symposium* (1992), Budapest (Hungary), August 17-20, 95.
10. E. ALBINA, Y. LEFORBAN, T. BARON, J. PLANA DURAN, P. VANNIER. Enzyme linked immunosorbent assay (Elisa) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *1st International Symposium on Swine Infertility and Respiratory Syndrome (SIRS, PRRS, PEARS)* (1992), Saint-Paul (Minnesota), May 17-19, 22.

11. E. ALBINA, P. VANNIER, F. MADEC, R. CARIOLET, J. TORRISON. Persistence of the Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome (PEARS) virus in Infected pigs and farm units. *13th International Pig Veterinary Society Congress* (1994), Bangkok (Thaïland), 26-30 June, 53.
12. J. TORRISON, P. VANNIER, **E. ALBINA**, F. MADEC, R. MORRISON. Incidence and clinical effect of PRRS virus infection in gilts on commercial swine farms. *13th International Pig Veterinary Society Congress* (1994), Bangkok (Thaïland), 26-30 June.
13. E. ALBINA, R. CARIOLET, M. KOBISCH. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) does not reduce the immune responses and disease susceptibility of pigs. *4th International Veterinary Immunology Symposium* (1995), Davis (California), July 16-21, 205.
14. M-F. LE POTIER, P. BLANQUEFORT, E. MORVAN, **E. ALBINA**. Results of a control program for PRRS in the French area "Pays de Loire". *2nd International Symposium on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS)* (1995), August 9th to 10th, Copenhagen (Denmark), 34.
15. L. PIRIOU, **E. ALBINA**. Swine lymphocyte proliferative and cytotoxic activities measured by flow cytometry. *3ème congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie* (1996), Rouen (France), 16-18 Octobre, 29.
16. A-M. TORCHE, P. LE CORRE, F. CHEVANNE, R. LE VERGE, G. CHENUT, **E. ALBINA** et A. JESTIN. Caractérisation de la phagocytose de microsphères polymériques à partir d'un modèle d'étude ex-vivo de macrophages alvéolaires de porc. *XIèmes Journées Scientifiques du Groupe Thématique de Recherche sur les Vecteurs* (1996), Paris (France), 12-13 décembre, 80.
17. R. LAROCHELLE, R. MAGAR, E. NELSON, J. NELSON, O. LEGEAY, **E. ALBINA**, A. JESTIN. Multiplex PCR assay for the differentiation between north American and European isolates of PRRS virus. *Conference of Research Workers in Animal Diseases* (1996), Chicago (USA), 11-12 November.
18. E. ALBINA, C. CARRAT, B. CHARLEY. Interferon alpha response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *5th International Veterinary Immunology Symposium*, Ludhiana (Inde), 8-13 novembre 1998, 133.
19. L. PIRIOU, E. ALBINA. Use of flow cytometry to evaluate the NK cell activity in swine. *5th International Veterinary Immunology Symposium*, Ludhiana (Inde), 8-13 novembre 1998, 239.
20. P. LE CANN, P. BLANCHARD, C. ARNAULD, **E. ALBINA**, E. HUTET, F. MADEC, P. MORVAN, E. EVENO, R. CARIOLET, A. JESTIN. Identification of a porcine circovirus associated with piglet wasting disease. *15th International Pig Veterinary Society Congress* (1998), Birmingham (UK), 5-9 July, 402.
21. E. ALBINA. A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *4th pestivirus meeting of the European Society of Veterinary Virology*, Giessen (Allemagne), 15-19 March 1999.
22. C. TRUONG, D. MAHE, Ph. BLANCHARD, R. CARIOLET, F. MADEC, **E. ALBINA**, A. JESTIN. Diagnostic spécifique du circovirus porcin de type II. *Journées Francophones de Virologie*, Paris (France), 22-23 avril 1999, in *Virologie* (1999), 3(2), 178.
23. E. HUTET, S. CHEVALLIER, M. ELOIT, A. TOURATIER, P. BLANQUEFORT, E. ALBINA. Detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) in blended sera or in blood samples collected on filter papers. *3rd international symposium on porcine reproductive and*

respiratory syndrome and Aujeszky's disease, Ploufragan (France), 21-24 June 1999, *Veterinary Research* (2000), 31 (1), 1-162.

24. F. MADEC, E. EVENO, P. MORVAN, L. HAMON, P. BLANCHARD, R. CARIOLET, N. AMENNA, H. MORVAN, C. TRUONG, D. MAHE, **E. ALBINA**, A. JESTIN. An emerging problem in the pig : PMWS (postweaning multi systemic wasting syndrome). *50th annual meeting of European Association for Animal Production*, Zurich (Switzerland), August (1999).
25. V. DUFOUR, S. CHEVALLIER, F. LEFEVRE, C. SOMASUNDARAM, C. ANDREONI, L. FISCHER, B. CHARLEY, J-C. AUDONNET, A. JESTIN, **E. ALBINA**. Modulation of host immune responses to a PRV DNA vaccine in pigs by coinoculation with plasmids expressing porcine cytokine. *XIth International Congress of Virology*, 9-13rd August (1999), Sydney (Australia) et *24th International Herpesvirus Workshop*, 17-23 July (1999), Boston (USA).
26. V. DUFOUR, O. LANTZ, I. PEGUILLET, K. MORVILLERS, **E. ALBINA**, A. JESTIN. Analysis of immune responses in PRV infected pigs by quantification of Th1 and Th2 cytokine mRNA. *XIth International Congress of Virology*, 9-13rd August (1999), Sydney (Australia) et *24th International Herpesvirus Workshop*, 17-23 July (1999), Boston (USA).
27. C. TRUONG, D. MAHE, Ph. BLANCHARD, M. LE DIMNA, R. CARIOLET, F. MADEC, A. JESTIN, **E. ALBINA**. Serological diagnosis of porcine circovirus type II infection (PCV II) associated with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *XIth International Congress of Virology*, 9-13rd August (1999), Sydney (Australia).
28. A. JESTIN, D. MAHE, P. BLANCHARD, R. CARIOLET, C. TRUONG, C. SOMASUNDARAM, F. LEFEVRE, F. MADEC, **E. ALBINA**. Protection of swine from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) conferred by porcine circovirus type 2 (PCV2) ORF2 protein. *17th meeting of the European Society of Veterinary Pathology*, Nantes (France), 14-17th September (1999), 242 et *XIth International Congress of Virology*, 9-13rd August 1999, Sydney (Australia).
29. D. MAHE, P. BLANCHARD, C. TRUONG, C. ARNAULD, F. MADC, R. CARIOLET, **E. ALBINA**, A. JESTIN. Development of molecular tools for the specific detection of antibodies to porcine circovirus type 2 (PCV2). *17th meeting of the European Society of Veterinary Pathology*, Nantes (France), 14-17th September (1999), 241
30. A. JESTIN, **E. ALBINA**. Virology and epidemiology of pig circovirus. *Congrès mondial vétérinaire*, Lyon (France), 24 septembre (1999).
31. V. DUFOUR, S. CHEVALLIER, R. CARIOLET, A. JESTIN, **E. ALBINA**. Modulation de l'immunité protectrice contre la maladie d'Aujeszky induite par un vaccin ADN. *2^{ème} Journées Francophones de Virologie*, in *Virologie* (2000), 4(2), 181.
32. A. JESTIN, D. MAHE, P. BLANCHARD, R. CARIOLET, C. TRUONG, C. SOMASUNDARM, F. LEFEVRE, F. MADEC, **E. ALBINA**. L'ORF2 du circovirus de type II protege le porcelet contre la maladie de l'amaigrissement. *2^{ème} Journées Francophones de Virologie*, in *Virologie* (2000), 4(2), 182.
33. D. MAHE, P. BLANCHARD, C. TRUONG, C. ARNAULD, R. CARIOLET, **E. ALBINA**, A. JESTIN. Immunoréactivité différentielle des protéines ORF2 de circovirus porcins et cartographie des épitopes. *2^{ème} Journées Francophones de Virologie*, in *Virologie* (2000), 4(2), 140.

34. D. MAHE, C. TRUONG, P. BLANCHARD, R. CARIOLET, F. MADEC, **E. ALBINA**, A. JESTIN. Differential protein recognition of ORF2 from porcine circovirus and epitope identification : application for the development of PCV2 diagnosis. *5th international congress of the European Society for Veterinary Virology* (2000), Brescia (Italy), 27-30 August, 259-260.
35. L. PIRIOU, E. HUTET, S. CHEVALLIER, A-F. SAINTILLAN, S. LE GAL, M-F. LE POTIER, **E. ALBINA**. Protection against classical swine fever virus infection conferred by antibodies or T lymphocytes after transfer in inbred pigs. *5th international congress of the European Society for Veterinary Virology* (2000), Brescia (Italy), 27-30 August, 426-427.
36. C. TRUONG, D. MAHE, P. BLANCHARD, M. LE DIMNA, F. MADEC, A. JESTIN, **E. ALBINA**. Identification of immunorelevant epitopes specific for porcine circovirus type 2 as serological marker for experimental and natural infection. *Proceedings of the 16th International Pig Veterinary Society* (2000), Melbourne (Australia), 17-21 September, 170.
37. P. MARTELLI, M. TERRENI, C. TRUONG, M. LE DIMNA, **E. ALBINA**, S. CAVIRANI. Retrospective serological study on PCV2, PRRSV, ADV-(gE) and Mycoplasma hyopneumoniae in a herd experiencing post-weaning multisystemic wasting syndrome in Italy. *Proceedings of the 16th International Pig Veterinary Society* (2000), Melbourne (Australia), 17-21 September, 653.
38. L. PIRIOU, E. HUTET, M-F. LE POTIER, V. DUFOUR, E. ALBINA. Cellular immune responses after classical swine fever virus (CSFV) infection. *6th International Veterinary Immunology Symposium*, Uppsala (Sweden), 15-20 July 2001, 156.

Brevets :

A. JESTIN, **E. ALBINA**, P. LE CANN, P. BLANCHARD, E. HUTET, C. ARNAULD. Séquence génomique et polypeptides de circovirus associé à la maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP), applications au diagnostic et à la prévention et/ou au traitement de l'infection. Brevet d'invention, 97 15396 et extension internationale PCT/FR98/02634. Un appel d'offre pour l'exploitation de la partie diagnostique du brevet a été effectué auprès de cinq industriels qui avaient manifesté un intérêt pour le dossier. La partie vaccin sera exploitée par l'industriel qui est associé au projet de recherche européen qui commence cette année.

B) Document de synthèse :

**De l'étude des virus et de leurs effets
pathogéniques à la conception d'outils de
diagnostic et de contrôle vaccinal**

B1) Avant-propos

Depuis plus de dix ans, mes activités de recherche au sein du Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires (CNEVA), devenu en 1999, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), ont été centrées sur la virologie et l'immunologie porcines. Mes objectifs principaux ont été d'étudier des virus responsables de grandes infections virales du porc, émergentes ou ré-émergentes pour mettre au point des outils de diagnostic et de contrôle vaccinal.

J'ai successivement conduit des recherches sur trois infections virales : le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP), la maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP) et la peste porcine classique (PPC). Le SDRP a été observé pour la première fois dans les élevages porcins en 1990 : il entraîne alors des troubles de la reproduction et une forte mortalité et mortalité périnatale. En moins de 4 mois, il décime 400 000 porcelets dans les élevages néerlandais puis gagne la Bretagne. En 1996, alors que le SDRP s'est largement répandu, la MAP émerge : elle entraîne un amaigrissement soudain des jeunes porcelets, suivi généralement de la mort en quelques jours. Près de 30% des porcelets âgés de 7 à 13 semaines peuvent succomber. Cette nouvelle pathologie prend alors le dessus sur le SDRP en terme d'incidence économique. En 1997, une grave épidémie de PPC se déclare en Hollande. Son éradication se soldera par l'abattage de 12 millions de porcs. La France est épargnée, mais la réintroduction récente de cette maladie virale très contagieuse en Allemagne (1999, 2000 et 2001), au Royaume Uni (2000) et en Espagne (2001), montre qu'elle reste une menace d'actualité. En outre, une infection endémique de PPC sévit sur les sangliers sauvages de l'est de la France depuis 1990. Elle menace à tout moment de diffuser aux porcs domestiques.

Face à ces trois fléaux, j'ai engagé des travaux de recherche personnelles et en parallèle, j'ai coordonné les activités de l'unité de virologie et immunologie porcines pour le développement d'outils capables de limiter les conséquences sanitaires et économiques de ces maladies. Ainsi, deux réactifs ELISA ont été mis au point, permettant le suivi de la diffusion des virus et la mise en place de mesures de lutte appropriées. Des études en immunopathogénie ont été entreprises pour comprendre les mécanismes d'action de ces virus, pour mieux adapter les outils de lutte vaccinale. De nouvelles stratégies de vaccination basées notamment sur l'ADN nu et l'immunisation par la voie orale ont été explorées dans le but améliorer l'efficacité et l'applicabilité des moyens de contrôle de l'infection à la faune sauvage.

Depuis mai 2000, j'exerce de nouvelles fonctions au Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD). J'axe mes recherches sur les grandes maladies virales touchant l'élevage des pays du Sud. Si les objectifs généraux restent inchangés (diagnostic, vaccins), le champ de mes activités s'élargit à des problématiques de développement et à d'autres espèces animales dont les ruminants.

B2) Etudes virologiques et pathogéniques : application à la mise au point d'outils de diagnostic

Mes premières activités de recherche en virologie ont porté sur le virus responsable du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP). Apparue en 1987, en Amérique du Nord, puis en 1990 en Europe, le SDRP, a rapidement diffusé et a eu une incidence majeure sur la santé des porcs. Dès le début de l'épizootie en Allemagne, j'ai été chargé d'élaborer un plan d'épidémiosurveillance en France, pour identifier précocement l'infection. Les deux premiers foyers de maladie en France ont été détectés en novembre 1991. Des prélèvements effectués dans le sixième foyer m'ont permis d'isoler le virus, moins de 3 semaines après la déclaration officielle de la maladie. L'isolat en culture pure a été inoculé à quatre truies EOPS gestantes. Le SDRP a alors été reproduit cliniquement sur deux truies (avortement et mortinatalité). Le réisolement du virus et les séroconversions spécifiques enregistrées 10 jours après l'infection des truies ont confirmé le rôle étiologique d'un virus dans ces manifestations cliniques. Les postulats de Koch (figure 1) étaient ainsi vérifiés.

Le virus du SDRP est un virus enveloppé à ARN monocaténaire de polarité positive comprenant 15 000 bases (figure 2). Inconnu dans l'espèce porcine avant 1990, il appartient à la famille des *Arteriviridae*, dans laquelle on retrouve un virus pathogène chez la souris (le virus éleveur de la lactate deshydrogénase, lactate dehydrogenase elevating virus, LDV), un virus pathogène chez le cheval (le virus de l'artérite équine, equine arterivirus, EAV) et un virus responsable d'une fièvre hémorragique chez le singe (simian hemorrhagic fever virus, SHFV).

Après l'isolement du virus, une de mes premières tâches a été de développer un outil de diagnostic. J'ai ainsi mis au point un test ELISA, approprié au diagnostic de routine sur une large échelle. Ce test ELISA sandwich indirect était validé en janvier 1992, soit moins de trois mois après l'apparition de la maladie en France. Il est basé sur la réaction des anticorps spécifiques du sérum des porcs infectés, sur des antigènes viraux produits en culture cellulaire *in vitro* et fixés par adsorption passive sur un support microplaque polystyrène. La révélation des anticorps spécifiques fixés sur l'antigène se fait de manière indirecte avec un antiserum conjugué à une enzyme dans une réaction immunoenzymatique colorée. Cette technique a été la première mise au point pour le diagnostic du SDRP. En 3 mois d'utilisation, plus de 3000 sérums ont été testés et 100 élevages infectés, détectés avec une grande fiabilité. Deux années plus tard, plus de 114 000 sérums avaient été analysés, produisant un diagnostic sur environ 30 % des élevages français. Ces résultats ont été valorisés dans diverses publications (Albina et al, 1992, Baron et al, 1992, Albina et al, 1993) et ont eu un écho positif auprès du Ministère de l'Agriculture et de la Forêt et du Ministère de la Recherche et de la Technologie (Annexe 1). Le test a fait l'objet d'une phase de développement industriel mais n'a pu malheureusement être commercialisé pour des raisons de brevet portant sur le virus. Cependant, dans sa version recherche, il a été décentralisé à deux laboratoires de diagnostic vétérinaire de 1992 à 1995, qui l'ont mis en œuvre pour soutenir plusieurs régions dans leurs efforts de contrôle de l'infection.

Les postulats de Koch

Postulat 1 : Le germe doit être trouvé dans les tissus affectés pour chaque cas de la maladie en question. Il doit être absent des individus sains.

Postulat 2 : Le germe doit être isolé des autres germes et du corps de son hôte. Il doit être propagé sur un hôte approprié, purifié et identifié sur la base de propriétés intrinsèques.

Postulat 3 : Le germe purifié doit provoquer la maladie lorsqu'il est injecté à des hôtes sains.

Postulat 4 : Le même germe doit pouvoir être ré-isolé à partir de ses nouveaux hôtes, inoculés expérimentalement. La condition du troisième postulat n'étant pas remplie, ce critère devient non pertinent.

Figure 1 : Les postulats de Koch définissent les critères de causalité entre un agent pathogène et une maladie

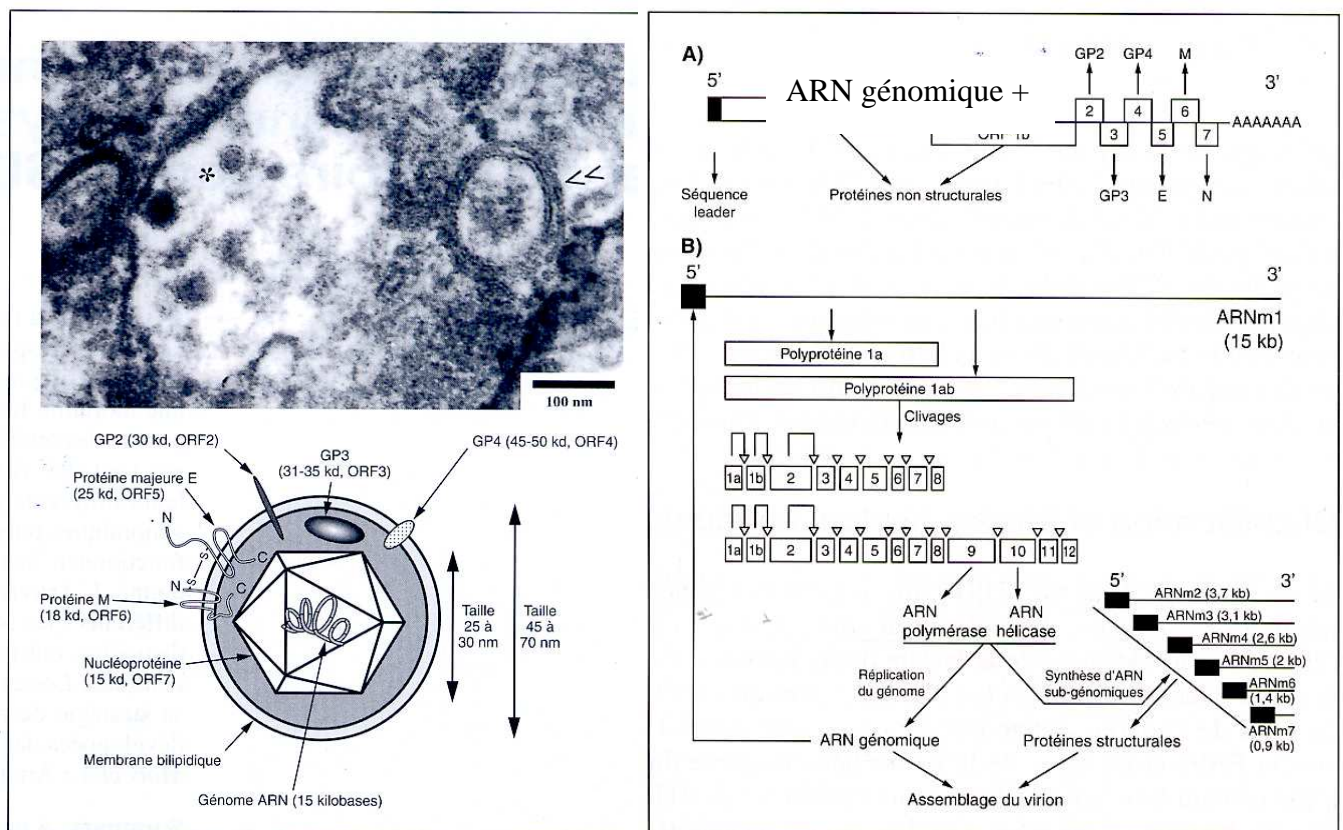


Figure 2 : Structure du virus SDRP et schéma de réplication. La photo représente un virion (*) et un complexe viral de réplication (<<). (Albina, 2000)

Les premières études moléculaires des isolats de SDRP ont montré qu'il existait au moins deux génotypes distincts, le premier sévissant en Amérique du nord et le second rencontré en Europe. Dans le but de déterminer si les variations entre génotypes et à l'intérieur de chaque génotype étaient de nature à mettre en défaut les outils de diagnostic disponibles, j'ai défini un travail de recherche portant sur la variabilité antigénique et moléculaire du virus SDRP. Ce travail a été confié à une étudiante en thèse d'Université, sous ma responsabilité. Une vingtaine de souches d'origine européenne a été analysée sur le plan antigénique avec un nombre identique d'anticorps monoclonaux, dont un, produit dans mon laboratoire. Cette étude a permis de montrer que les épitopes sur la nucléoprotéine du virus, reconnus par les anticorps monoclonaux, étaient très conservés entre souches et entre génotypes européen et américain (tableau 1). Une étude complémentaire sur la variabilité moléculaire du gène codant pour la nucléoprotéine virale a montré la bonne conservation de cette portion du génome viral. Elle a cependant montré des variations entre génotypes nord-américains et européens rendant ces deux groupes phylogénétiquement distincts (figure 3). Pour cette raison, ils ne peuvent dériver directement l'un de l'autre mais sont plus vraisemblablement issus d'un ancêtre commun, encore non identifié.

Dans ce travail, la variabilité antigénique s'observait en fait sur les épitopes portés par les glycoprotéines membranaires externes du virus (tableau 1). Cette variabilité intervenait sur des isolats apparentés, séparés seulement de quelques passages sur porcs infectés de manière persistante. Des mutations au niveau génomique sur des progénies virales obtenues *in vivo*, ont été également confirmées (Allende et al, 2000). Ce mécanisme de variation est supposé conférer un avantage au virus, pour échapper aux réponses immunitaires de l'hôte et se maintenir ainsi de façon persistante. L'ensemble des travaux sur la variabilité antigénique et génomique du virus SDRP a été valorisé par l'obtention d'un titre de docteur de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Rennes et la publication de deux articles scientifiques internationaux (Le Gall et al, 1997 et 1998).

Nous avons vu que le diagnostic de l'infection, portant sur la détection d'anticorps sériques majoritairement dirigés contre la nucléoprotéine virale bien conservée, ne risquait pas d'être mis en échec. Mettant à profit cette bonne conservation du gène de la nucléoprotéine et la stratégie de réplication du virus, basée sur la production d'ARN subgénomiques polycistroniques (figure 2), j'ai collaboré à la mise au point d'un test de détection quantitatif du génome viral par RT-PCR, portant sur l'amplification du cadre de lecture ouvert 7 (ORF7). Chaque ARN subgénomique contenant l'ORF7, le choix de cette séquence pour la RT-PCR se justifiait dans un but de détectabilité maximale. Cet outil a permis d'évaluer la charge virale excrétée dans la semence de verrats infectés (Le Geay et al, 1997). Il permettra également de suivre l'ARN viral circulant dans le sang périphérique au cours de la phase d'infection persistante des porcs et constituera ainsi un important outil de détection de l'infection dans les élevages.

Table III. IPMA reactivity of MAbs against European and Canadian PRRSV isolates.

Origin Virus strain	Monoclonal antibody															
	Protein specificity															
	N							M		GP4		GP3			nd	
	1CH5	P3/27	WBE1	WBE4	WBE5	WBE6	126.9	122.9	2C12	P3/35	122.68	P9/A3-20	WBE2	122.14	44H8	
F	II															
III																
IV	+						-	-	-	+	+	-	+			
V	+						-	+	+	+	+	+	+			
VI	+						-	+	+	+	+	+	+			
IX	+	-	-	-	-	+	-	+	+							
E	I						+	-	-	-	+	-	+	+		
56237	+						-	-	-	+	-	+	+			
56239	+						-	-	-	+	+	+	+			
56240	+						-	-	-	+	-	+	+			
56241	+						-	-	-	+	-	+	+			
56243	+						-	-	-	+	-	+	+			
2.96	+						-	-	-	-	+	+	+			
L51/2/92	+	-	-	-	-	-	-	+	-							
NL	NL 2.2						+	-	+	-	+	+	+			
NL 4.1	+						-	-	-	+	-	+	+			
GB	H2						+	-	-	-	+	+	+			
NY3	+						-	-	-	+	-	+	+			
B	AV 30						+	-	-	-	+	-	+			
							+	-	-	-	+	-	+	+		
D	2.72						+	-	+	+	+	+	+			
2.25	+						-	+	+	+	+	+	+			
C	94-807	-		-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+		
LHVA-92-2	-	-		-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+		
LHVA-94-7	-	-		-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-		

+: positive reaction; -: negative reaction; nd: non determinated
F: France; E: Spain; NL: the Netherlands; GB: United Kingdom; B: Belgium; D: Germany; C: Canada

Tableau 1 : Réactivité de différents anticorps monoclonaux dirigés contre différents épitopes de protéines virales (N : nucléoprotéine, M : protéine membranaire, GP4 et 5 : glycoprotéines membranaires) et sur différentes souches virales. Les épitopes de la nucléoprotéine sont conservés entre souche européennes, certains étant également retrouvés sur des souches canadiennes (encadré vert, partie gauche du tableau). Les souches F II et FIII sont liées : FIII a été ré-isolée d'un porcelet infecté par contact avec des porcelets âgés de 22 semaines, infectés de façon persistante avec FII. Elles diffèrent d'un épitope sur la GP3 (Le Gall et al, 1997).

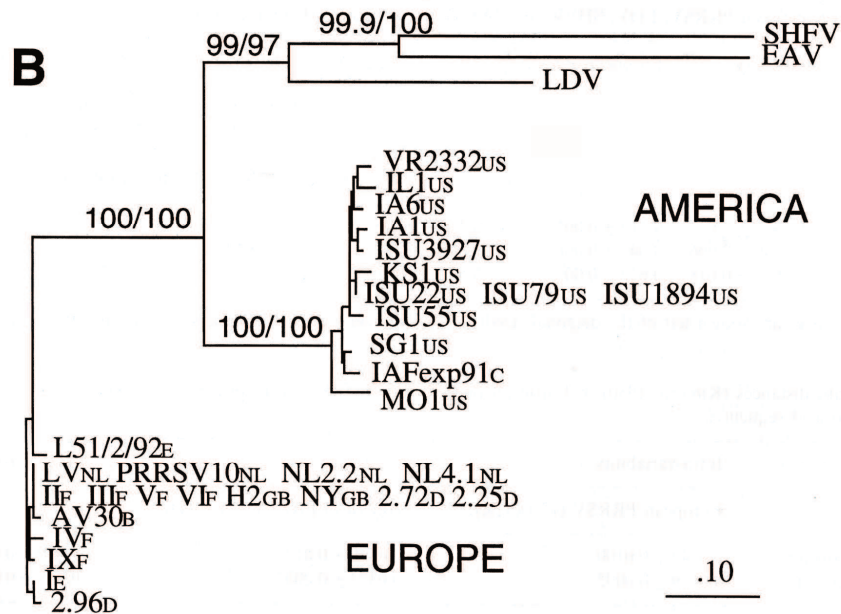


Figure 3 : Arbre phylogénétique basé sur la comparaison des séquences peptidiques de la nucléoprotéine de souches SDRP en comparaison avec d'autres artérovirus (cheval : EAV, singe : SHFV, souris : LDV). Deux groupes phylogénétiques distincts se dégagent : américain versus européen (Le Gall et al, 1998).

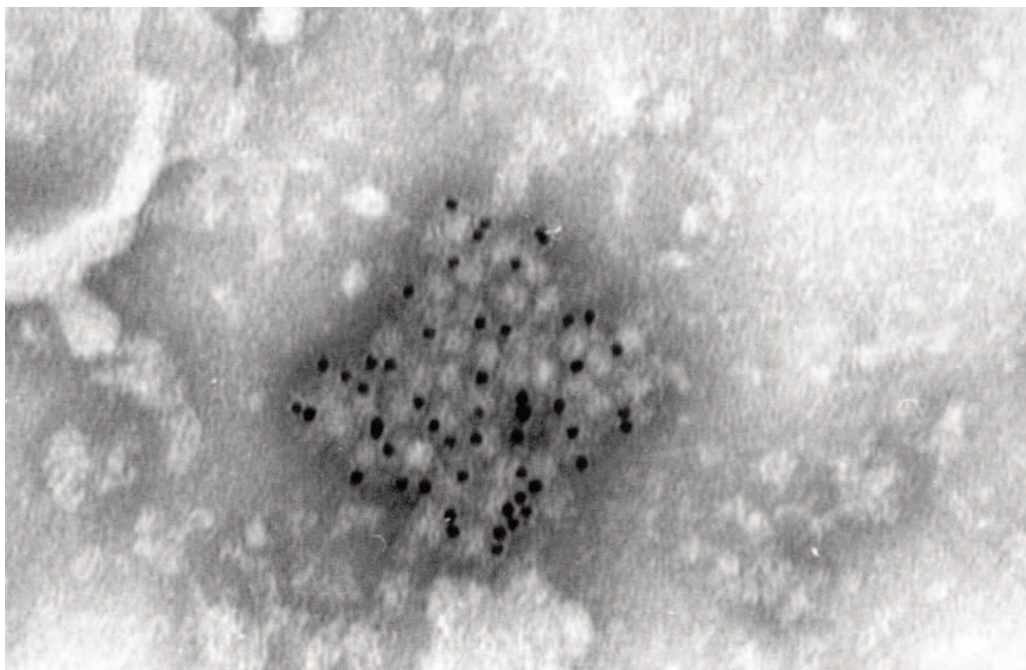
En juin 1996, une nouvelle pathologie, la maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP), apparaît chez le porc. Pour faire face à la demande urgente de diagnostic, j'ai réorganisé les activités de l'unité. Etant à la fois chercheur et animateur sur ce projet, l'ensemble des résultats obtenus doivent être considérés avant tout comme une réalisation collective. Toutefois, ma contribution a été plus particulièrement déterminante dans la mise au point d'un modèle expérimental et d'un outil de diagnostic sérologique.

Très rapidement par des essais expérimentaux, j'ai montré que la MAP était d'origine virale. Le virus associé à cette pathologie a été visualisé en microscopie électronique et caractérisé comme morphologiquement proche des circovirus (figure 4). En revanche, le virus du SDRP n'était pas en cause, contrairement aux affirmations de l'époque, relayées par les vétérinaires et les éleveurs confrontés à la maladie. Les circovirus sont des petits virus nus à ADN monobrin circulaire de 1700 bases environ, apparentés aux circovirus et géminivirus très répandus dans le règne végétal. Chez l'animal, seul les circovirus aviaires étaient décrits comme pathogènes. Chez le porc, un circovirus avait été identifié de longue date mais aucun pouvoir pathogène n'avait pu lui être attribué. En outre, ce circovirus était retrouvé comme contaminant non cytopathogénique de certaines lignées cellulaires d'origine porcine. A partir de prélèvements effectués sur des animaux malades, des essais d'isolement en culture cellulaire indemne de contamination circovirale, m'ont permis de mettre en évidence un circovirus non cytopathogénique (révélation en immunoenzymologie et en microscopie électronique). Le virus a été cloné puis séquencé. Les études moléculaires ont confirmé sa parenté avec les circovirus déjà décrits. Ce nouveau circovirus, dit de type II par opposition au circovirus porcin de type I connu depuis très longtemps, a fait l'objet d'un dépôt à la collection des organismes de l'Institut Pasteur et d'un dépôt de brevet (Jestin et al, 1997). La comparaison des séquences nucléotidiques entre les deux types de circovirus a montré des variations allant jusqu'à 20 % dans certaines portions du génome. Ces variations sont probablement à l'origine de l'acquisition du pouvoir pathogène chez le porc.

Peu après l'isolement et la caractérisation de ce circovirus de type II, j'ai mis au point un modèle expérimental reproductible de la maladie. Ce modèle est unique dans le sens où de nombreuses équipes internationales ont échoué dans la reproduction expérimentale de cette maladie. Pour illustrer la difficulté de cette mise au point, nous avons été confrontés aux observations suivantes : des animaux d'élevages en phase d'incubation ou en phase initiale de maladie, transférés dans nos animaleries expérimentales, récupéraient rapidement contrairement à leurs congénères restés en élevage. Pour contourner ces difficultés de reproduction expérimentale, j'ai dû utiliser des porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiés, âgés de 6 à 7 semaines, inoculés par voie intramusculaire et par voie intratrachéale avec une charge virale de $10^{4,5}$ et $10^{5,2}$ doses infectieuses (DI)50, respectivement. La charge virale a été produite sur porc, elle n'a fait l'objet d'aucun passage *in vitro* sur culture cellulaire, susceptible d'altérer la virulence de l'isolat. Ce modèle expérimental, reproduit une dizaine de fois, a été décrit dans le brevet (Jestin et al, 1997) et est en cours de publication (Albina et al, 2001). Il a permis de réaliser des avancées déterminantes dans la mise au point d'outils de diagnostic et de contrôle vaccinal de l'infection par le circovirus de type II.

En janvier 1998, j'ai recruté un scientifique post-doctorant sur convention pour renforcer l'équipe travaillant sur la MAP. J'ai encadré ce chercheur pour le développement d'un outil de diagnostic

sérologique. A cette époque, la MAP ne pouvait être diagnostiquée que par les signes cliniques typiques qu'elle occasionnait chez les porcelets. Il y avait donc un besoin aiguë d'outils de diagnostic, notamment sérologiques, spécifiques du circovirus de type II. J'ai confié le développement d'un test ELISA à ce chercheur post-doctorant qui, après neuf mois de travail, a pu contourner les difficultés liées à l'identification d'un antigène spécifique du circovirus de type II, virus très proche sur le plan antigénique du circovirus de type I. Le test mis au point repose sur l'utilisation d'un peptide dérivé de la capsid virale. Ce peptide a été identifié à l'aide d'un pepscan, c'est à dire d'une membrane sur laquelle sont fixés des peptides de 14 acides aminés chevauchant d'un acide aminé, sur toute la longueur de la séquence peptidique de la capsid virale. Cette membrane est mise en présence de différents sérums de porcs infectés et l'on repère alors les peptides immunogéniques. Un de ces peptides a été utilisé avec succès pour réaliser le diagnostic sérologique de l'infection en plaques polystyrène de 96 puits par ELISA sandwich indirect (Truong et al, 2001). A l'instar de la démarche adoptée pour le test ELISA SDRP, ce test a été décentralisé à deux laboratoires d'analyses vétérinaires. Plusieurs milliers de sérologies ont été effectuées dans le but de déterminer la prévalence de l'infection à l'échelon national. En parallèle, des discussions avec des industriels devaient aboutir à l'industrialisation et à la commercialisation d'une trousse de diagnostic. Dans la mesure où le test a été breveté par nos soins, les écueils rencontrés lors de l'industrialisation du kit SDRP seront évités.



100 nm

Figure 4 : Visualisation en microscopie électronique du circovirus porcin de type 2, agrégé par un antisérum de porc convalescent et marqué par la protéine A couplée à des billes d'or colloïdal de 10 nm (Albina et al, 2001)

B3) Etudes immunopathogéniques : aide au contrôle de l'infection et développement de vaccins

B3-1) – Etude du pouvoir immunodépresseur des virus :

Le virus du SDRP est-il immunodépresseur chez le porc ? Le passage du virus dans les élevages est suivie pendant une longue période, d'une altération de la santé des animaux, liée au développement de surinfections bactériennes. Dans les cas les plus dramatiques, le virus a été qualifié de « SIDA » du porc. Pour répondre à la question initiale et le cas échéant disposer des connaissances de base nécessaires au développement d'outils de contrôle vaccinal appropriés, j'ai entrepris un travail de recherche sur 3 ans, dans le cadre de ma thèse d'Université.

Après infection expérimentale, les porcs ont du virus circulant dans le sang périphérique sur une période d'au moins 4 semaines (Albina et al, 1994). En outre, par immunodépression chimique (injection de corticoïdes à haute dose), j'ai pu induire la réexcrétion du virus, 22 semaines après primo-infection, alors que le virus n'était plus détectable dans le sang périphérique depuis au moins 15 semaines. Cette infection de longue durée devait être démontrée au préalable avant toute investigation sur l'immunodépression chronique, présumée induite par le virus. J'ai alors étudié les effets de cette persistance virale sur certaines fonctions du système immunitaire. Des porcs virémiques depuis plus de 2 semaines, mais n'exprimant plus de signes cliniques, ont été immunisés avec des glycoprotéines d'un autre virus, le virus de la maladie d'Aujeszky (VMA). Les réponses immunitaires humorales (anticorps neutralisant le VMA *in vitro*) et cellulaires (évolution des différentes sous-populations lymphocytaires du sang périphérique, capacité proliférative générale ou spécifique du VMA) ont été évaluées en comparaison avec des porcs non infectés par le virus du SDRP. Aucune de ces réponses n'a été affectée chez les porcs infectés de façon persistante par le virus SDRP. Au contraire, la production d'anticorps a été plus rapide chez ces porcs en comparaison avec les porcs témoins non infectés (Albina et al, 1998). Ces résultats ont été confirmés par De Bruin et al (2000) qui montrent que l'infection SDRP peut altérer certains paramètres immunologiques dans la phase aiguë de l'infection, mais que ces altérations sont de courte durée et n'affectent pas, dans la phase chronique de l'infection, les réponses immunitaires contre le virus de la maladie d'Aujeszky.

Après trois à quatre semaines de virémie, j'ai observé en outre, une augmentation des lymphocytes CD8+ dans le sang périphérique (Albina et al, 1998). Cette augmentation était déjà décrite avec un isolat de génotype américain (Shimizu et al, 1996). Mes résultats montrent que le génotype européen produit les mêmes effets. L'augmentation des lymphocytes CD8+ est concomitante d'une élimination progressive du virus du sang périphérique. Elle pourrait correspondre à un recrutement tardif de lymphocytes cytotoxiques capables d'éliminer les cellules infectées par le virus du SDRP. Cette dernière hypothèse a été vérifiée récemment au niveau du poumon, site de réplication initiale du virus, où 21 jours après infection, une infiltration importante de cellules CD8+ avec une activité cytolytique est notée (Samsom et al, 2000). De plus, *in vitro*, il est possible, après trois semaines de mise en culture de cellules blanches du sang périphérique avec du virus SDRP, de générer des lymphocytes CD8+ à activité cytolytique (Lopez-fuertes et al, 1999).

Retour à la question initiale : comment le virus SDRP peut-il affecter durablement la santé des porcs d'élevages alors qu'il n'exerce pas d'effet immunodépresseurs lors de la phase d'infection persistante ?

Un début de réponse peut-être donné en combinant les effets de l'infection aiguë (dans les 2 premières semaines post-infection) et le maintien d'une activité virale sur les jeunes animaux en croissance, sevrés et ne bénéficiant plus de la protection maternelle transmise par le lait. J'ai observé que l'immunité d'origine maternelle transférée aux jeunes porcelets était de courte durée (inférieure à 4 - 8 semaines), laissant une large proportion d'animaux sensibles à l'infection (âgés de 10 à 14 semaines). Par ailleurs, certains porcs infectés peuvent héberger et excréter du virus sur une longue période. Dans ces conditions, et compte tenu de la promiscuité importante existant entre animaux d'âges différents au sein des élevages, la circulation du virus est grandement facilitée (Albina et al, 1994). En raison de la synchronisation de la naissance des porcelets, sur une fréquence courte de une à trois semaines, on obtient là les conditions favorables pour le maintien d'une circulation virale stable entre animaux plus âgés et jeunes porcelets en rupture d'immunité maternelle. Ce sont ces porcelets qui ont alors une immunité compromise par infection aiguë avec le virus SDRP et qui, dans des conditions d'élevages concentrationnaires, sont à même de relancer des infections bactériennes secondaires.

Restait alors à démontrer l'effet du virus SDRP sur la résistance des porcelets, dans la phase aiguë de l'infection. Les cibles cellulaires exclusives du virus sont les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Ces cellules jouent un rôle essentiel dans les défenses anti-infectieuses qu'elles soient non spécifiques ou spécifiques de l'antigène. Elles sont capables de phagocyter et de dégrader les microorganismes, et d'initier des réponses immunitaires spécifiques de ces microorganismes. Elles peuvent ainsi créer les conditions d'une réponse inflammatoire permettant le recrutement de cellules immunocompétentes. Elles appréhendent les antigènes pour les présenter aux cellules immunocompétentes et secrètent des cytokines ou chimiokines propres à déclencher et activer une réponse immune.

Le virus SDRP infecte généralement le porc par la voie oronasale et se multiplie très rapidement dans les macrophages pulmonaires entraînant une réduction de 50% de leur population, 7 jours après infection. Cette réduction entraîne une diminution de la résistance antibactérienne au niveau local. En outre, le macrophage est une cellule phagocytaire productrice d'interféron alpha, capable d'induire un état de résistance antivirale et de moduler les réponses immunitaires anti-infectieuses. Chez la souris, le LDV induit la production d'interféron alpha mais semble être résistant à cette réponse antivirale (Plagemann et al, 1995). Je me suis donc intéressé à étudier *in vitro* les effets du virus sur la capacité des macrophages à induire un état de résistance anti-virale. Le virus SDRP est sensible *in vitro* à l'induction d'un état de résistance antivirale lié à l'interféron alpha. En montrant que le virus inhibait précocement, la capacité du macrophage infecté à sécréter de l'interféron alpha (tableau 2), j'ai mis en évidence une propriété immunosuppressive du virus. J'ai ensuite montré *in vivo* que la production d'interféron alpha était réduite par rapport à d'autres modèles expérimentaux d'infection virale. Cette production d'interféron alpha *in vivo* disparaît dans les 4 jours qui suivent l'infection, alors que le virus continue de circuler sur plus de quatre semaines (Albina et al, 1998). Cette

altération de la synthèse d'interféron alpha après infection a été confirmée par Buddaert et al (1998) et Van Reeth et al (1999).

Cette inhibition peut contribuer à l'établissement de la persistance virale chez l'hôte. En neutralisant le système interféron propre à inhiber sa réplication initiale et à initier les réponses immunitaires spécifiques, le virus peut moduler les effecteurs immunitaires de l'hôte capables de contrôler sa réplication. Par ailleurs, l'inhibition de l'interféron alpha par le virus du SDRP est de nature à rendre le porc infecté moins résistant à d'autres infections virales : ces hypothèses issues des résultats générés *in vitro* ont été confirmés par des infections virales mixtes SDRP - grippe ou coronavirus respiratoire – grippe *in vivo* (Van Reeth et al, 1999). Dans le premier cas, la multiplication du virus grippal n'était pas inhibée par le virus du SDRP et le tableau clinique était aggravé, alors que dans le second cas, le coronavirus respiratoire, fort inducteur d'interféron, inhibait la réplication du virus grippal et réduisait les conséquences cliniques globales.

Le virus SDRP est en outre capable d'inhiber la production du facteur de nécrose tumoral alpha (TNF alpha) *in vivo* (Van Reeth et al, 1999) et *in vitro* (Chiou et al, 2000, Lopez-Fuertes et al, 2000). Il serait également non inducteur d'interféron gamma *in vitro* et *in vivo* (Zuckermann, communication personnelle). L'ensemble de ces résultats illustrent les différentes stratégies adoptées par le virus pour manipuler le système immunitaire de l'hôte, au moins dans la phase initiale de l'infection, dans le but d'échapper à son contrôle. Par ce biais, le virus est capable de diminuer la résistance générale des porcs dans la phase aiguë de l'infection.

Durée d'incubation (en heures)					
0	6	13	19	43	66
Traitement des macrophages		Dosage interféron alpha dans le surnageant (U/ml)			
Infection SDRP	-	0	0	0	0
-	Induction interféron	240	400	430	290
Infection SDRP	Induction interféron	0	0	0	0
-	Infection SDRP et induction interféron	150	230	320	NT

Tableau 2 : Effet du virus SDRP sur l'induction de la sécrétion d'interféron alpha dans les macrophages alvéolaires de porc. L'infection SDRP 6 heures avant induction, inhibe la sécrétion d'interféron alpha. En revanche, l'infection simultanément à l'induction ne produit pas d'inhibition de la sécrétion. NT : non testé. (Albina et al, 1998)

En résumé, le virus SDRP persiste chez l'hôte pendant au moins quatre semaines, en neutralisant des réponses immunes propres à contrôler sa réplication. Outre son effet cytopathogénique sur les macrophages et autres cellules présentatrices d'antigène, il inhibe très précocement la production d'interféron alpha, de TNF alpha et probablement d'autres cytokines. Ces effets observés dans la phase initiale de l'infection aident le virus à se maintenir chez l'hôte mais également contribuent à diminuer la résistance anti-infectieuse générale des porcs infectés. En revanche, dans la phase persistante de l'infection (après 2 semaines d'infection), le virus SDRP n'inhibe plus les fonctions immunitaires. Progressivement, le porc développe une réponse immune (dont un indicateur est l'augmentation des lymphocytes CD8+ périphériques et locaux ayant potentiellement une fonction cytotoxique), capable d'éliminer le virus après 4 semaines d'infection. Pour l'ensemble des travaux effectués sur le virus SDRP, j'ai obtenu le titre de Docteur de l'Université de Rennes I en juin 1997 (très honorable avec félicitations du jury).

L'émergence de la maladie de l'amaigrissement du porcelet ne m'ont pas permis d'approfondir les mécanismes viraux modulant la réponse immune des porcs et les réponses immunitaires impliquées dans le contrôle de la réplication du virus SDRP un mois après infection. En revanche, une stratégie similaire à celle développée pour le SDRP a été adoptée pour répondre à deux types de questions concernant la MAP. En premier lieu, le circovirus ne semble infecter que les monocytes/macrophages, or il est assez fréquent de voir des déplétions lymphocytaires marquées : quels sont les mécanismes en jeu ? En second lieu, les porcs atteints semblent succomber de surinfections et dans notre modèle expérimental, le circovirus induit une pathologie mais pas de mortalité : ce virus est-il immunodépresseur ? L'étude de ces hypothèses constitue un des volets d'un projet de recherches plus large portant sur la maladie de l'amaigrissement du porcelet, proposé et accepté au niveau du 5^{ème} programme cadre européen « Recherche et développement en qualité de la vie et management des ressources du vivant ». Ce projet implique l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments de Ploufragan, l'Institut Robert Koch de Berlin, la Faculté Vétérinaire de Barcelone et un industriel. La première partie de ce projet consistera à vérifier si le circovirus MAP est capable d'induire l'apoptose cellulaire *in vitro* et *in vivo*. Certains virus produisent leurs effets pathogéniques par l'induction de l'apoptose cellulaire, à distance, sur des cellules non infectées. Il s'agira ici de montrer si le circovirus est doué d'une telle propriété. Dans ce cas, l'identification du mécanisme responsable de ces effets ainsi que du gène viral responsable seront entrepris. Les résultats d'une telle étude pourrait trouver une valorisation dans le développement d'un virus atténué pouvant avoir un intérêt vaccinal. Si le virus n'induit pas l'apoptose, alors d'autres mécanismes pathogéniques seront recherchés, notamment ceux mis en jeu dans une réaction inflammatoire mal contrôlée (production excessive de cytokines proinflammatoires telles que le TNF α , l'IL1 et l'IL6).

B3-2) - Développements immunologiques :

Le développement dans l'unité d'une thématique forte en immunologie porcine a été un objectif personnel, car il répondait à un besoin d'investigation approfondie dans nos divers modèles d'infection virale (immunodépression des virus SDRP et MAP, vaccination orale contre la peste porcine classique). Les réponses immunitaires antivirales comprennent des réponses non spécifiques précoces (interférons, cytotoxicité cellulaire naturelle contre des cellules infectées) et des réponses spécifiques acquises (anticorps neutralisants, cytotoxicité cellulaire déterminée par les anticorps ou cytotoxicité spécifique de l'antigène présenté par les molécules de classe I ou II du complexe majeur d'histocompatibilité). La connaissance de ces différents effecteurs antiviraux est de première importance pour notre laboratoire. J'ai donc engagé l'unité dans le développement de méthodes d'étude des différentes réponses immunitaires antivirales chez le porc.

Les tests commerciaux disponibles en immunologie porcine étant limités, une grande partie de nos activités a été dévolue à la mise au point de nouvelles méthodes d'investigation immunologique. Dans l'unité, sont maîtrisées les techniques d'études des réponses en anticorps sériques. Plus récemment, j'ai développé des techniques de quantification des anticorps IgA muqueux et des anticorps IgM, IgG1, IgG2 sériques et des techniques de quantification des cellules sécrétrices de ces anticorps (ELISPOT).

L'étude de l'activation du système interféron a été effectuée dans le modèle de l'artérovirus porcin (syndrome dysgénésique et respiratoire porcin, SDRP). Menée en collaboration avec l'INRA de Jouy-en-Josas, elle nous a permis de disposer des techniques d'études d'interférence virale et de dosage d'une activité interférogène (alpha et gamma). En parallèle, j'ai conduit la mise au point d'un test de mesure de l'activité cytotoxique naturelle utilisant la cytométrie en flux. Le développement de ce test a été effectué dans le cadre de la préparation du diplôme d'Ecole Pratique des Hautes Etudes puis du DEA de L. Piriou, qu'elle a soutenus en 1997 et 1998. Le test est fonctionnel chez le porc. Le principe est basé sur le marquage fluorescent de cellules cibles permettant de les séparer des cellules effectrices par cytométrie en flux. Les cellules cibles lysées par les effecteurs cytotoxiques après un contact de quatre heures sont repérées par un marqueur de viabilité cellulaire fluorescent. Il est alors possible de déterminer le nombre de cellules cibles lysées par rapport au nombre total de cibles présentes dans le test. Ce test a été évalué avec succès dans d'autres espèces que le porc telles que la poule et le lapin (travail en collaboration avec l'unité de recherche et d'appui technique Virologie, Immunologie et Parasitologie Avicole et Cunicole de l'AFSSA Ploufragan), le poisson (travail en collaboration avec l'Unité de Virologie et Immunologie Moléculaire de l'INRA Jouy-en-Josas), la souris et l'homme (travail en collaboration avec le Laboratoire d'Immunologie du centre hospitalier régional de Rennes). Aussi sensible que le test classique de relargage du chrome 51 (Piriou et al, 2000), le test basé sur la cytométrie en flux est utilisé comme alternative au test radioactif (figure 5). Le test au chrome 51 a été écarté dans notre laboratoire pour des raisons d'équipements, de gestion de déchets radioactifs et d'une manière plus générale, de sécurité du personnel. La cytométrie en flux selon le même principe a été utilisée pour mesurer une activité des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifique du virus grippal chez la souris (Piriou et al, 2000) et plus récemment, chez le porc, contre le virus de la peste porcine classique (voir ci-après).

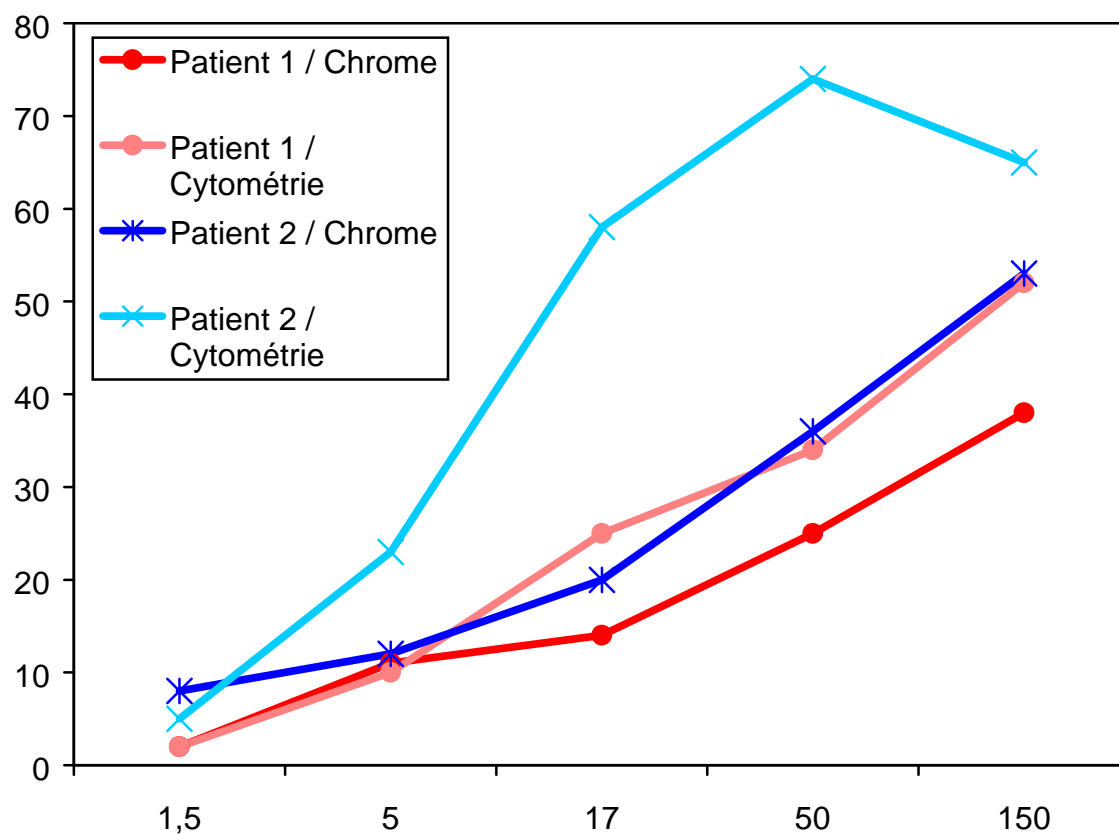
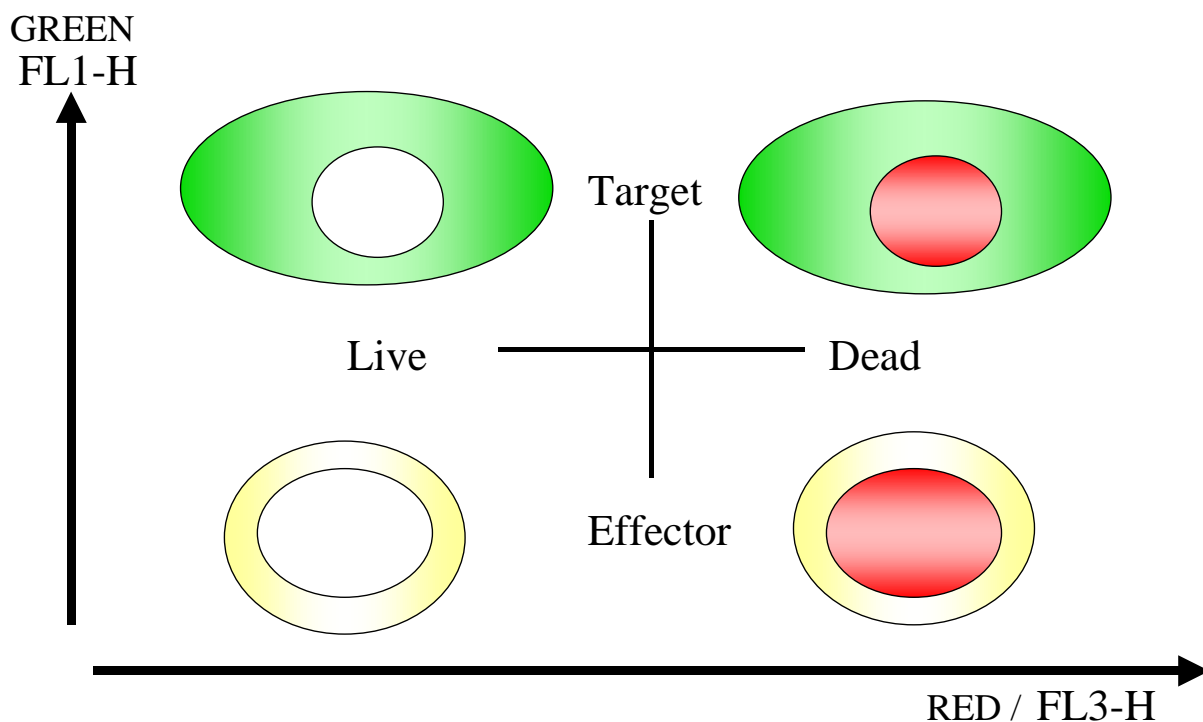
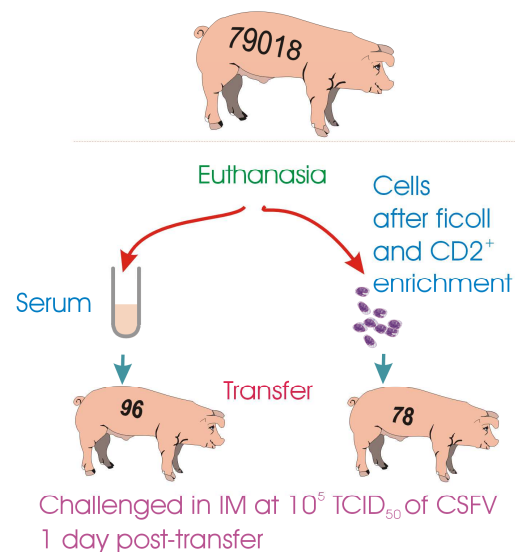


Figure 6 : Principe de la mesure d'activité cytotoxique cellulaire *in vitro* par cytométrie en flux (les cellules cibles sont marquées avec un fluorochrome vert avant contact avec les cellules effectrices, puis la viabilité cellulaire est mesurée après contact, par incorporation d'un fluorochrome « vital » rouge). Validation de la méthode par rapport à la technique de relargage du chrome radioactif (deux patients, testés avec différents rapports entre cellules effectrices (PBMC) et cellules cibles (K562)), (Piriou et al, 2000).

Dans le prolongement de ce travail sur le développement de méthodes d'études de la cytotoxicité cellulaire, j'encadre depuis 1999 une thèse d'Université visant à identifier les effecteurs immunitaires protecteurs contre le virus de la peste porcine classique et les antigènes cibles de ces effecteurs. Bien qu'il existe depuis plusieurs décennies des vaccins vivants atténués qui induisent une bonne protection contre la maladie, il y a aujourd'hui un besoin pour développer des vaccins de nouvelle génération conférant une bonne protection contre l'infection et possédant un marqueur intrinsèque permettant de faire la distinction entre animal vacciné et animal infecté. D'un point de vue théorique, le meilleur vaccin marqué est celui qui possède une délétion d'un gène codant pour une protéine structurale par rapport au virus sauvage. Dans ces conditions, tout animal possédant des anticorps contre le produit du gène délété sera un animal infecté. Le virus de la peste porcine classique possède quatre protéines structurales, dont seulement deux entraînent la production d'anticorps neutralisant le virus *in vitro*. Le choix des gènes à déléter est donc restreint. Pour optimiser ce choix, il y a un intérêt à mieux étudier les réponses immunitaires générées contre les différentes protéines virales, en incluant les réponses anticorps mais également et surtout les réponses de type cytotoxique pouvant jouer un rôle dans le contrôle de la réplication virale.

Pig control not immunised not challenged



Conclusion : Transfer of antibodies induce a better protection than transfer of CD2+ immune cells

Immunisation by coglapest and challenged at 10⁵ TCID₅₀ of CSFV

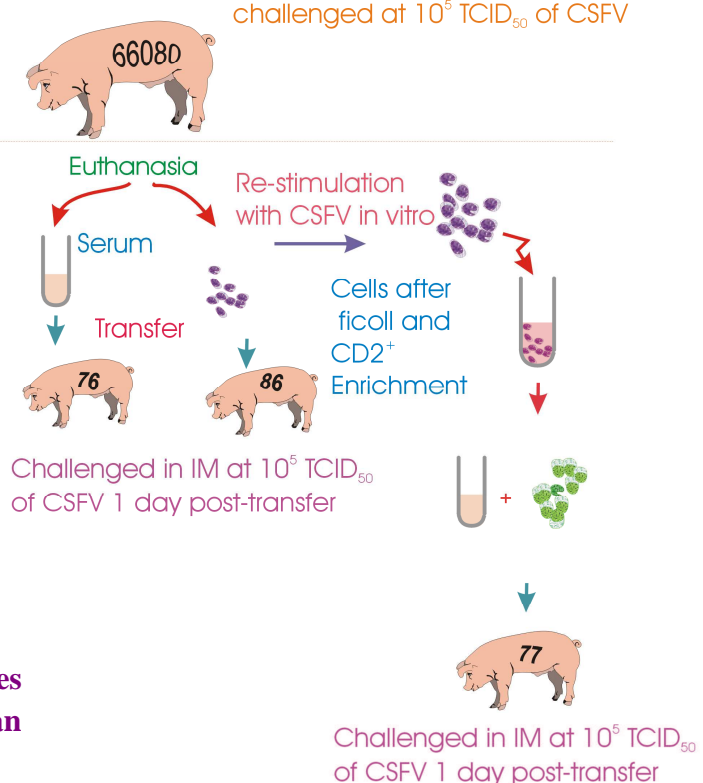


Figure 6 : Transfert d'immunité chez le porc histocompatible et analyse des effecteurs immunitaires intervenant dans la protection contre le virus de la peste porcine classique (PPC ou CSF). (Piriou et al, en préparation).

Ce travail de caractérisation des réponses immunitaires contre le virus PPC, conduit par L. Piriou, comprend une première phase de transferts d'immunité chez le porc histocompatible afin d'identifier les composantes immunitaires responsables de la protection (figure 6). Après caractérisation des réponses mises en jeu, nous avons montré que les réponses induites préférentiellement après vaccination puis infection par le virus sont plutôt à médiation humorale (anticorps, figure 7). En revanche, chez les animaux seulement infectés par le virus, nous avons observé en plus de la réponse à médiation humorale, une réponse mettant en jeu les lymphocytes T CD8+. Chez ces mêmes porcs, nous obtenons une activité CTL élevée au 25^{ème} jour post-infection, alors que les porcs vaccinés puis infectés n'ont pas d'activité CTL détectable. Cette activité CTL atteint 40% sans restimulation *in vitro* et 70% après restimulation *in vitro* (pour un ratio effecteur / cible de 50, Piriou et al, en préparation). Les porcs simplement infectés développent donc une activité CTL associée à une forte réponse de type humoral. En revanche, les porcs vaccinés puis infectés semblent plutôt privilégier une réponse de type humoral. Dans les deux cas cependant, la protection clinique apparaît identique. La suite de cette étude, visera à tester les différents antigènes viraux cibles de ces différents effecteurs immunitaires (préparation de vecteurs de gènes du virus de la peste porcine classique et expression *in vitro* et *in vivo*), en vue de sélectionner les meilleurs candidats vaccinaux.

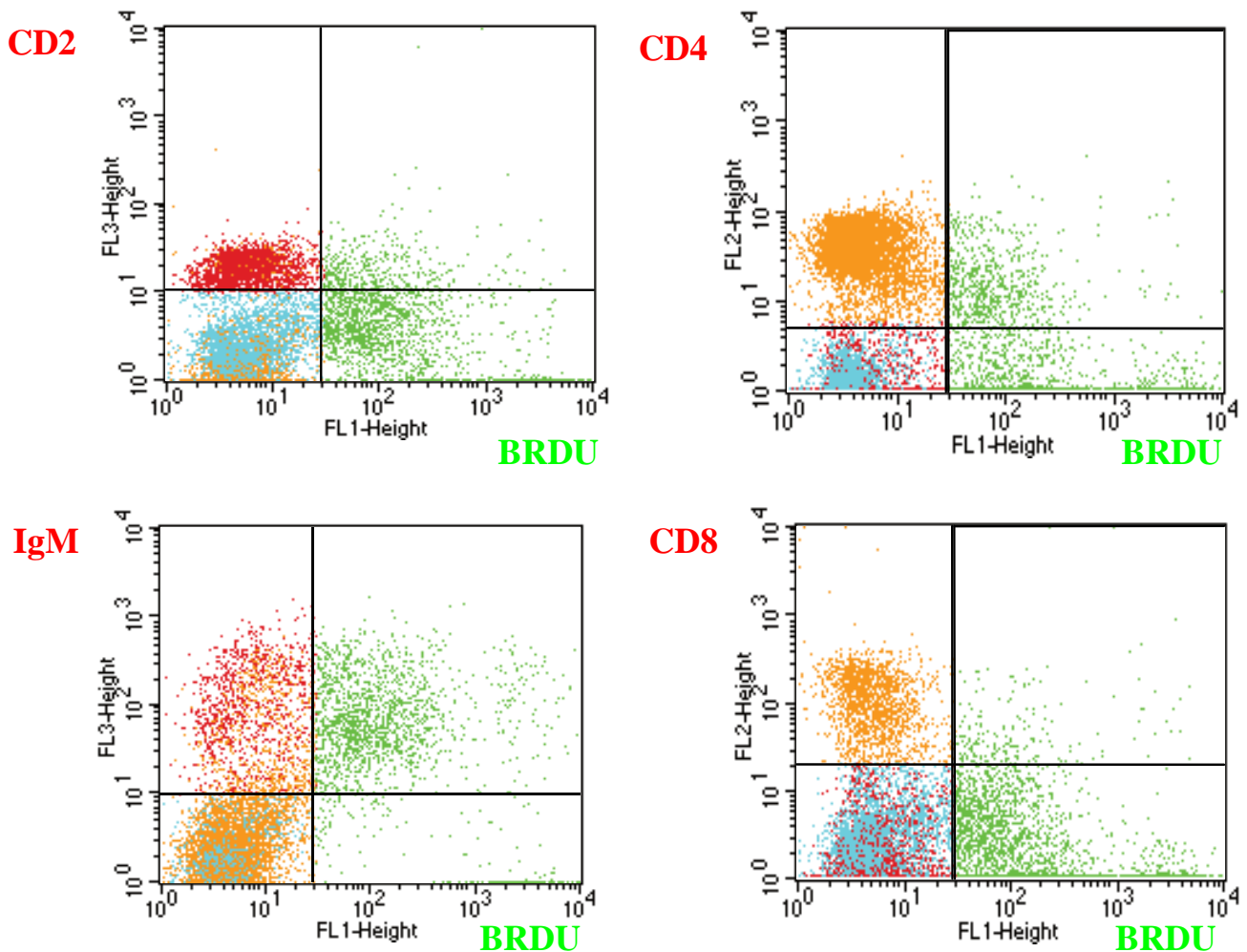


Figure 7 : Caractérisation des sous-populations lymphocytaires isolées de porcs vaccinés contre la peste porcine classique, puis infectés par le virus. Les PBMC sont restimulés *in vitro* par le virus avant marquage. Les cellules qui prolifèrent (incorporation de BrDU) sont les lymphocytes T CD4+ (helper) et les cellules B (IgM+). (Piriou et al, en préparation).

B3-3) – Nouvelles stratégies vaccinales : modulation des réponses immunes par l'ADN nu et immunisation par voie orale

1 - Vaccination par l'ADN nu

La possibilité d'immuniser des porcs avec de l'ADN nu a déjà été démontrée (Gerdt et al, 1997). L'immunisation était obtenue par l'injection intramusculaire de 100 microgrammes de plasmides contenant un gène codant pour une protéine immunogénique, placé sous la dépendance d'un promoteur du cytomégalovirus humain. Toutefois, l'efficacité de ce type d'immunisation restait inférieure à celle conférée par un vaccin classique, atténué. C'est pourquoi, début 1998, nous nous sommes lancés dans un projet européen portant sur la vaccination génétique du porc, dans lequel nous avons évalué l'effet immunoadjuvant de cytokines de porc délivrées sous forme d'ADN nu. J'en ai assuré la coordination au niveau de l'AFSSA Ploufragan en étroite collaboration avec André Jestin du service de biologie moléculaire. L'objectif de notre projet était d'améliorer l'efficacité de la vaccination par l'ADN nu. Dans le cadre de ce projet, j'ai recruté un scientifique post-doctorant qui a effectué tout d'abord un travail de mise au point sur la détection quantitative des transcrits de cytokines porcines. Cet outil devait nous permettre d'appréhender le profil Th1/Th2 like chez le porc, dans nos modèles d'infection virale. Le profil Th1 comprend les cytokines interféron-gamma (IFN γ), IL2. Schématiquement, il oriente chez la souris, les réponses immunitaires vers une activité cytotoxique spécifique de l'antigène. En revanche, le profil Th2 formé par les cytokines IL4 et IL10, oriente les réponses vers la synthèse d'anticorps. Bien que cette dichotomie de la réponse T auxiliaire n'ait pas encore été établie chez le porc, la production de ces différentes cytokines est évaluée dans de nombreux modèles d'infection viraux ou bactériens. Par la technique RT-PCR, utilisant un contrôle interne de taille identique à la cytokine d'intérêt, nous avons pu développer une méthode quantitative d'analyse des transcrits de cytokines porcines, soient, l'IL2, l'IL4, l'IL10 et l'IFN γ (Dufour et al, 1999).

Au cours de ce projet, nous avons conduit deux essais sur porcs avec différentes cytokines de porcs. Les porcs ont reçu 100 μ g de chaque plasmide (un plasmide codant pour une cytokine et 3 plasmides codant pour 3 glycoprotéines membranaires du virus de la maladie d'Aujeszky). Le GM-CSF s'est avéré le plus intéressant pour augmenter la protection induite par les autres plasmides antigéniques. L'IL12 a été neutre, alors que l'interféron alpha a eu un effet négatif. Ces trois cytokines, choisies initialement pour leurs effets bénéfiques potentiels sur l'immunité antivirale à médiation cellulaire, peuvent également modifier *in vitro* la synthèse d'ARN messagers de l'IL2, IL4 et IFN γ , dans les lymphocytes de porcs, restimulés *in vitro* avec le virus. Ainsi, le GM-CSF augmente la synthèse de messagers de l'IL2, de l'IL4 et de l'IFN γ . Ces résultats témoignent d'un effet positif sur la réponse de type Th1 (médiation cellulaire) et Th2 (médiation humorale), ce qui correspond à la réponse attendue après immunisation avec de l'ADN nu suivie d'une épreuve infectieuse virale (Dufour et al, 2000). La vaccination par l'ADN nu s'est révélé être d'une efficacité surprenante quand nous l'avons comparée à un vaccin protéique commercial. Dans le dernier essai *in vivo*, les porcs vaccinés une fois avec de l'ADN nu (codant pour l'antigène et le GM-CSF) ont une protection sensiblement équivalente aux porcs vaccinés deux fois (primovaccination et rappel) avec le vaccin commercial.

Forts de ce succès, nous avons développé une approche de même type pour immuniser des porcs contre le virus MAP. Le modèle expérimental que j'ai développé nous a permis d'effectuer un essai d'immunisation contre le circovirus. Pour immuniser les porcs, nous avons choisi d'injecter de l'ADN nu codant pour la capsid virale et le GM-CSF. Trois semaines après l'injection, les porcs ont été éprouvés. En protégeant les porcs contre la MAP, cet essai nous a permis de confirmer le rôle direct du circovirus dans le déclenchement de la pathologie.

La vaccination par l'ADN nu, validé dans deux de nos modèles d'infection virale, nous semble donc particulièrement prometteuse chez le porc.

2 - Vaccination orale et microsphères biodégradables

Les sangliers d'Europe constituent un réservoir de maladies virales infectieuses pouvant atteindre les porcs domestiques. Dans l'est de la France, les sangliers sont infectés par le virus de la peste porcine classique (PPC). Une politique complète de contrôle des infections virales chez le porc domestique ne peut faire l'impasse sur le réservoir «sanglier». Pour autant, la seule stratégie envisageable pour cette population sensible est le contrôle de l'infection par la vaccination orale. Dès 1995, je me suis intéressé à la possibilité d'immuniser les porcs et les sangliers par la voie orale en utilisant une souche vaccinale vivante atténuée de PPC, habituellement utilisée par voie intramusculaire. Bien qu'efficace et sans risque pour d'autres espèces sauvages (Chenut et al, 1998), l'utilisation d'une telle souche se heurte au risque de diffusion dans l'environnement, d'inactivation trop rapide dans le milieu extérieur entraînant une efficacité réduite de la vaccination et à l'impossibilité de faire la distinction entre un animal vacciné et un animal infecté. C'est pourquoi, j'ai initié en 1996, un travail de recherches en collaboration avec le Laboratoire de Pharmacie Galénique de la Faculté de Pharmacie de Rennes. Il s'agit d'un travail à long terme qui vise à étudier la possibilité de préparer des formes de libération prolongée d'antigènes incorporés en microsphères biodégradables et administrées par voie orale. En utilisant un antigène protéique sous-unitaire du virus, il est alors possible de préparer un outil de diagnostic différentiel animal vacciné / animal infecté, en utilisant un marqueur de l'infection par le virus sauvage.

La vaccination par voie orale des sangliers sauvages puis des porcs domestiques avec des microsphères biodégradables a pour objet d'induire une immunité durable grâce à la libération soutenue et prolongée de l'antigène. J'ai développé un modèle quantitatif d'étude de la phagocytose de microsphères biodégradables par des macrophages de porc (figure 8). Il permet de tester «l'appétence» de différentes préparations de microsphères pour les cellules apprêtant l'antigène, comme les macrophages (Torché et al, 1999 et 2000). Deux protéines modèles différentes, l'albumine bovine et l'IgY d'œuf de poule, ont été incorporées avec succès dans les microsphères. Elles conservent leurs propriétés antigéniques et sont libérées progressivement dans le temps. Administrées soit par gavage gastrique, soit dans une anse intestinale isolée, nous avons pu montrer que les microsphères étaient prises en charge par les cellules M des plaques de Peyer puis délivrées aux cellules macrophagiques sous-jacentes (Torché et al, 2000). Les plaques de Peyer sont les sites d'induction de la réponse immunitaire associée aux muqueuses. Des microsphères chargées en IgY,

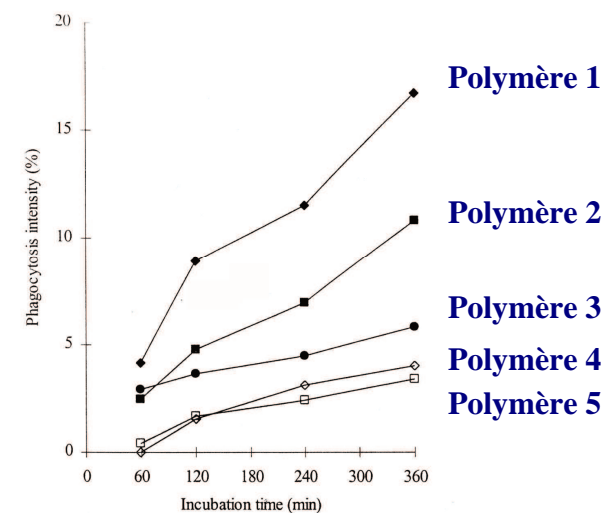
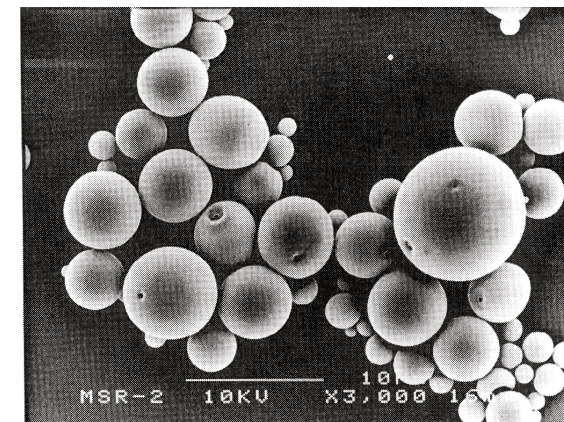
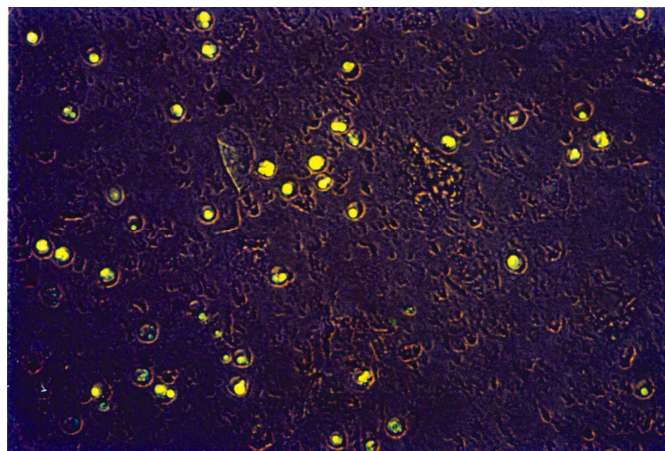
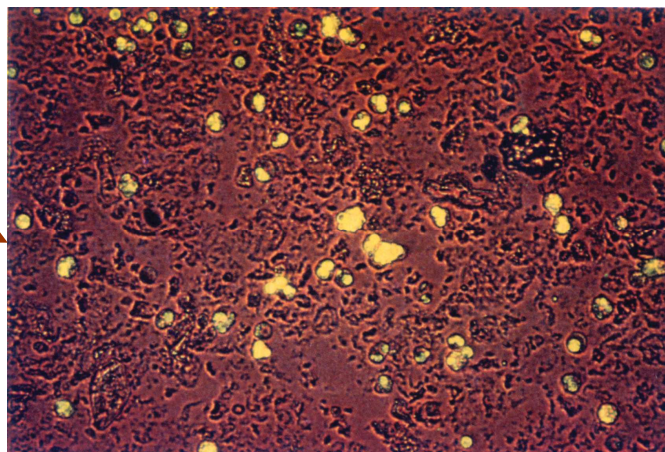
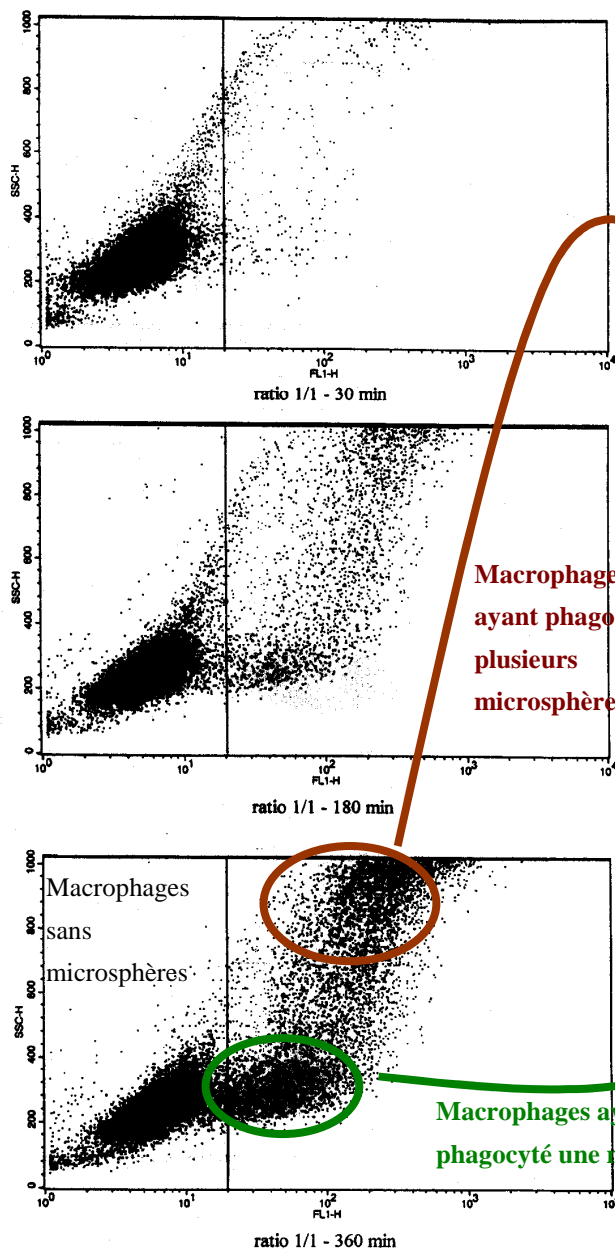


Figure 8 : Evaluation quantitative par cytométrie en flux, de la capacité des macrophages alvéolaires de porc à phagocyter des microsphères biodégradables fluorescentes (mise en contact de macrophages avec des microsphères en proportion 1 pour 1, sur 30, 180 et 360 minutes). Morphologie des microsphères (en microscopie électronique) et effet de leur composition sur l'efficacité de la phagocytose. (Torché et al, 1999 et 2000).

protéine facilement purifiable en grande quantité et fortement immunogène chez le porc, ont été administrées *in vivo* chez le porc : des réponses en anticorps ont été obtenues lorsque les microsphères ont été administrées une fois sans adjuvant par voie intramusculaire. Aucune réponse sérique n'a été détectée lorsque les microsphères ont été administrées par voie orale. Il semble toutefois que la quantité de protéine délivrée fût insuffisante. Ces travaux sont actuellement poursuivis. Sur ce projet, une thèse d'Université a été soutenue en décembre 2000 (très honorable). J'ai proposé et obtenu le recrutement pour deux ans, du scientifique qui a conduit ces travaux, dans l'objectif de prolonger les recherches dans cette voie.

Par ailleurs, j'ai demandé à un scientifique de l'unité de s'engager dans l'identification des antigènes du virus de la peste porcine classique impliqués dans les réponses immunitaires protectrices au niveau local. Son travail consistait en premier lieu à injecter directement au niveau de la plaque de Peyer, les différentes protéines virales et à tester la réponse immunitaire spécifique locale. Au travers du titrage des anticorps IgA associés à la muqueuse, du dénombrement des cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques au niveau des ganglions mésentériques et de la capacité des lymphocytes des ganglions à répondre *in vitro* à une restimulation antigénique, les antigènes d'intérêt sont identifiés. Ils seront alors produits en système baculovirus, purifiés et incorporés en microsphères. D'ici là, nous prévoyons que les modalités d'induction d'une réponse immunitaire locale à l'aide de microsphères auront été mieux définies, par notre équipe ou par la communauté scientifique intéressée par cette approche. Ainsi, nous pourrons effectuer les premiers tests de vaccination-épreuve infectieuse dans le modèle de la PPC.

B3-4) – Nouvelles perspectives au sein du Centre de Coopération internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD)

Depuis mai 2000, je suis chercheur au CIRAD. Toutefois, mes nouvelles activités de recherche restent proches des problématiques abordées à l'AFSSA. Il s'agit d'explorer les mécanismes d'échappement aux réponses immunitaires développés par le virus de la peste porcine africaine (PPA).

Les compétences et les outils que j'ai acquis ces dix dernières années seront mis à profit pour améliorer les outils de diagnostic et de contrôle de la peste porcine africaine. La PPA résulte de l'infection par un virus à double enveloppe et à ADN double brin de 170 000 bases. Ce virus très proche des *Poxviridae* appartient à la famille des *Asfarviridae* dont il est actuellement le seul représentant. Comme les poxvirus, il possède des gènes codant pour des protéines ayant un effet modulateur sur le système immunitaire (analogue de CD2, inhibiteur du facteur nucléaire NFkB...). Associée à une importante variabilité antigénique, ces propriétés virales expliquent pourquoi, après plus de 30 ans de recherche sur ce virus, aucun vaccin efficace n'a pu être produit. Mon nouvel objectif de recherche vise à caractériser sur le plan moléculaire la variabilité de certains gènes viraux d'intérêt immunologiques (gènes codant pour des facteurs de réplication ou pour des protéines structurales) ; Puis de déterminer les zones antigéniques intéressantes, conservées sur les produits de ces gènes, et de les analyser comme cibles potentielles des anticorps ou des lymphocytes cytotoxiques (CTL). L'analyse de ces cibles antigéniques reposera sur l'utilisation d'oligopeptides exprimés en Coli, de peptides synthétiques mis en contact avec des antisérums, et de lignées

cellulaires histocompatibles transfectées avec des gènes d'intérêt ou « sensibilisées » avec des peptides synthétiques pour les tests de cytotoxicité cellulaire. Ce programme s'inscrit dans un consortium européen associant 7 laboratoires, constitué pour développer des outils de contrôle de l'infection. A terme, le projet devra définir les bases théoriques du développement rationnel d'un vaccin, permettant d'orienter les réponses immunitaires protectrices contre des antigènes conservés : pour ce faire des stratégies basées sur l'ADN nu ou sur un vaccin vivant recombinant seront envisagés.

B4) Organisation de la recherche et gestion de projets

L'efficacité de la recherche repose sur une phase créative, génératrice d'hypothèses, qui doit être ensuite déclinée en projet(s) de recherche. La conduite de chaque projet nécessite un animateur, une organisation dans le temps et une évaluation puis une valorisation finale. Au cours de ces dix dernières années, j'ai pu mettre en œuvre ces différentes étapes, en tant que chercheur, chef de projet et responsable d'équipe.

De 1990 à 2000, j'ai été responsable des différents projets de recherche portant sur le SDRP, la MAP et l'immunologie porcine. J'ai ainsi conduit mes propres activités de recherche et encadré trois étudiantes en thèse d'Université et différents stagiaires post-doctorants.

En juillet 1992, j'ai accepté la responsabilité du service de virologie porcine du CNEVA de Ploufragan et la gestion de la recherche de ce service, devenu unité de recherches et d'appui scientifique et technique en janvier 1996. J'ai exercé cette responsabilité jusqu'en avril 2000. Animant une équipe de 10 à 15 personnes, comprenant au moins 4 scientifiques, j'ai déterminé et organisé les nombreuses activités de l'unité dans les domaines de la recherche, du diagnostic et du contrôle des grandes maladies virales du porc. J'ai planifié avec le personnel et en accord avec le directeur, les grandes orientations scientifiques et techniques de l'unité. J'ai également assumé la gestion administrative de l'unité (gestion du personnel, recrutements, attribution des responsabilités, entretien/notation, politique de formation et de communication interne). J'ai eu à établir le budget de l'unité (besoins en fonctionnement et en investissements), à identifier et obtenir des sources de financement au niveau départemental, régional, national et européen.

J'ai essayé de remplir au mieux mon rôle d'animateur en fonction des orientations scientifiques et stratégiques, des nécessités de service et des souhaits de chacun. L'équilibre reposait sur une forte motivation et mobilisation personnelles et a nécessité de redéfinir en permanence les actions prioritaires. Toutefois, cette réactivité et cette adaptabilité reposaient sur une capitalisation des différents acquis en virologie et en immunologie, permettant des valorisations de bon niveau en terme de publications scientifiques.

Depuis mai 2000, je travaille au Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, comme responsable d'un projet de recherche sur la peste porcine africaine. En février 2001, j'ai en outre pris la responsabilité de l'unité de virologie du programme santé animale. A la tête d'une équipe de 9 personnes dont 6 scientifiques, j'ai l'opportunité de prolonger mon développement professionnel et personnel dans le domaine de la virologie et de l'immunologie avec l'objectif finalisé de contribuer au contrôle des pathologies virales majeures des ruminants et des porcins dans les pays en voie de développement.

B5) Conclusion générale

A l'intersection de la virologie et de l'immunologie, les recherches conduites dans l'unité que je dirigeais jusqu'en avril 2000 ont été stimulantes et ont trouvé une valorisation directe dans le contrôle des grandes infections virales du porc. Les différentes réalisations obtenues ces dernières années m'incitent à poursuivre dans cette voie au sein du CIRAD, où j'aurai pour mission particulière de développer mes recherches sur le diagnostic et la vaccination contre le virus de la peste porcine africaine et d'animer une équipe de recherche travaillant sur les grandes maladies virales des ruminants et des porcins. Une reconnaissance de mes capacités à diriger des recherches et à former par la recherche des jeunes scientifiques est désormais indispensable à l'essor de mes nouvelles thématiques de recherche.

A titre personnel, mes premières expériences d'encadrement de scientifiques et mon rôle d'animateur d'équipe de recherche ont été très formateurs. Au-delà des règles de management indispensables et pour lesquelles j'ai suivi une formation adaptée en 1995, j'ai appris à connaître l'importance des relations humaines. Bien souvent, pour avancer dans ce domaine et régler les difficultés, j'ai eu recours à une stratégie inspirée de la démarche scientifique. Celle-ci consistait pour l'essentiel, à initier une réflexion collective pour identifier les problèmes, dégager une hypothèse de travail, expérimenter la solution retenue et évaluer le résultat. Les résultats positifs obtenus jusqu'alors, m'inclinent à penser que l'ouverture et la rigueur sont, certes indispensables à la conduite de projets de recherche, mais également indispensables à la direction des Hommes qui font cette recherche.

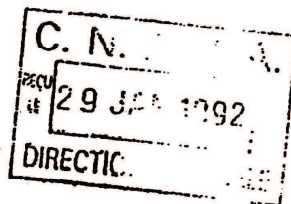
B6) Références complémentaires

- Allende R, Laegreid WW, Kutish GF, Galeota JA, Wills RW, Osorio FA. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J Virol* 2000, 74, 10834-10837.
- Buddaert W, Van Reeth K, Pensaert M. In vivo and in vitro interferon (IFN) studies with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Adv Exp Med Biol* 1998, 440, 461-467.
- Chiou MT, Jeng CR, Chueh LL, Cheng CH, Pang VF. Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (isolate tw91) on porcine alveolar macrophages in vitro. *Vet Microbiol* 2000, 71, 9-25.
- De Bruin MG, Samsom JN, Voermans JJ, van Rooij EM, De Visser YE, Bianchi AT. Effects of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the development of the immune response against pseudorabies virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2000, 76, 125-135.
- Gerdt V, Jons A, Makoshey B, Visser N, Mettenleiter TC. Protection of pigs against Aujeszky's disease disease by DNA vaccination. *J Gen Virol* 1997, 78, 2139-2146.
- Lopez Fuertes L, Domenech N, Alvarez B, Ezquerra A, Dominguez J, Castro JM, Alonso F. Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. *Virus Res* 1999, 64, 33-42.
- Lopez-Fuertes L, Campos E, Domenech N, Ezquerra A, Castro JM, Dominguez J, Alonso F. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus down-modulates TNF-alpha production in infected macrophages. *Virus Res* 2000, 69, 41-46.
- Plagemann PG, Rowland RR, Even C, Faaberg KS. Lactate dehydrogenase-elevating virus: an ideal persistent virus? *Springer Semin Immunopathol* 1995, 17, 167-186.
- Samsom JN, de Bruin TG, Voermans JJ, Meulenbergh JJ, Pol JM, Bianchi AT. Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8(+) cells. *J Gen Virol* 2000, 81, 497-505.
- Shimizu M, Yamada S, Kawashima K, Ohashi S, Shimizu S, Ogawa T. Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Vet Immunol Immunopathol* 1996, 50, 19-27.
- Van Reeth K, Labarque G, Nauwynck H, Pensaert M. Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. *Res Vet Sci* 1999, 67, 47-52.

Annexe

LE MINISTRE

16932 / B



MINISTRE
DE LA RECHERCHE
ET DE LA TECHNOLOGIE



Paris, le : 27 JANV. 1992

Monsieur le directeur général,

Mes services m'ont fait part de l'efficacité dont a fait preuve le Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires dans l'isolement du virus responsable du syndrome dysgénique et respiratoire du porc, maladie déclarée officiellement pour la première fois en France en Novembre 1991.

A la suite de l'isolement rapide du virus, les chercheurs du Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires ont également réussi à mettre au point une technique rapide de diagnostic sérologique (ELISA) de la maladie. Ce test représentera un outil précieux dans le contrôle du développement de cette pathologie porcine et devrait assurer notre indépendance dans ce domaine.

Je vous exprime, ainsi qu'aux chercheurs de votre établissement auxquels en revient le mérite, ma satisfaction pour cette avancée significative dans le domaine de la pathologie animale. Je me réjouis particulièrement d'un tel résultat, et note avec plaisir que vos collègues s'attachent à le valoriser rapidement par des publications scientifiques. Ceci me semble tout à fait important à l'aube de cette année 1992 qui verra un renforcement, par le biais d'une inscription au budget civil de recherche et de développement, des liens entre le Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires et la communauté scientifique française.

Veillez agréer, Monsieur le Directeur Général, mes salutations distinguées.

Cordialement vtre.

Hubert CURIEN

Monsieur MEURIER
Directeur Général
Centre National d'Etudes
Vétérinaires et Alimentaires
22 Rue Pierre et Marie Curie
B.P. 19
94701 MAISONS-ALFORT Cedex

1, rue Descartes, 75005 PARIS. Tél. : 46.34.